Ce texte constitue seulement un outil de documentation et n'a aucun effet juridique. Les institutions de l'Union déclinent toute responsabilité quant à son contenu. Les versions faisant foi des actes concernés, y compris leurs préambules, sont celles qui ont été publiées au Journal officiel de l'Union européenne et sont disponibles sur EUR-Lex. Ces textes officiels peuvent être consultés directement en cliquant sur les liens qui figurent dans ce document

►B

RÈGLEMENT (CE) Nº 440/2008 DE LA COMMISSION

du 30 mai 2008

établissant des méthodes d'essai conformément au règlement (CE) nº 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH)

(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

(JO L 142 du 31.5.2008, p. 1)

Modifié par:

		Journal officiel		
		nº	page	date
►M1	Règlement (CE) nº761/2009 de la Commission du 23 juillet 2009	L 220	1	24.8.2009
►M2	Règlement (UE) nº 1152/2010 de la Commission du 8 décembre 2010	L 324	13	9.12.2010
►M3	Règlement (UE) nº 640/2012 de la Commission du 6 juillet 2012	L 193	1	20.7.2012
►M4	Règlement (UE) nº 260/2014 de la Commission du 24 janvier 2014	L 81	1	19.3.2014
►M5	Règlement (UE) nº 900/2014 de la Commission du 15 juillet 2014	L 247	1	21.8.2014
►M6	Règlement (UE) 2016/266 de la Commission du 7 décembre 2015	L 54	1	1.3.2016
►M7	Règlement (UE) 2017/735 de la Commission du 14 février 2017	L 112	1	28.4.2017
►M8	Règlement (UE) 2019/1390 de la Commission du 31 juillet 2019	L 247	1	26.9.2019

▼B

RÈGLEMENT (CE) N° 440/2008 DE LA COMMISSION

du 30 mai 2008

établissant des méthodes d'essai conformément au règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH)

(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

Article premier

Les méthodes d'essai à appliquer aux fins du règlement (CE) n° 1907/2006 sont définies à l'annexe du présent règlement.

Article 2

La Commission procède, si nécessaire, à une révision des méthodes d'essai établies dans le présent règlement en vue de remplacer, réduire ou affiner les essais menés sur les animaux vertébrés.

Article 3

Toutes les références à l'annexe V de la directive 67/548/CEE s'entendent comme des références au présent règlement.

Article 4

Le présent règlement entre en vigueur le jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel de l'Union européenne*.

Il s'applique à compter du 1er juin 2008.

▼B

ANNEXE

▼M6

Note:

Avant d'utiliser une des méthodes d'essai décrites ci-après pour tester une substance multiconstituants (MCS), une substance de composition inconnue ou variable, un produit de réaction complexe ou une matière biologique (UVCB), ou un mélange, et lorsque l'applicabilité de la méthode d'essai n'a pas été clairement établie pour les MCS, les UVCB ou les mélanges, il convient de se demander si la méthode est appropriée aux fins réglementaires prévues.

Si la méthode d'essai est utilisée pour tester une MCS, une UVCB ou un mélange, il y a lieu de mettre à disposition, dans la mesure du possible, suffisamment d'informations sur la composition, notamment en indiquant la nature chimique des constituants, leurs proportions et leurs propriétés pertinentes.

▼B

PARTIE A: MÉTHODES DE DÉTERMINATION DES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

TABLE DES MATIÈRES

A.1. TEMPÉRATURE DE FUSION/DE CONGÉLATION

A.2. TEMPÉRATURE D'ÉBULLITION

A.3. DENSITÉ RELATIVE

A.4. PRESSION DE VAPEUR

A.5. TENSION SUPERFICIELLE

A.6. SOLUBILITÉ DANS L'EAU

A.8. COEFFICIENT DE PARTAGE

A.9. POINT D'ÉCLAIR

A.10. INFLAMMABILITÉ (SOLIDES)

A.11. INFLAMMABILITÉ (GAZ)

A.12. INFLAMMABILITÉ (AU CONTACT DE L'EAU)

A.13. PROPRIÉTÉS PYROPHORIQUES DES SOLIDES ET DES LIQUIDES

A.14. DANGER D'EXPLOSION

A.15. TEMPÉRATURE D'INFLAMMATION SPONTANÉE DES LIQUIDES ET DES GAZ

A.16. TEMPÉRATURE RELATIVE D'INFLAMMATION SPONTANÉE POUR LES SOLIDES

A.17. PROPRIÉTÉS COMBURANTES (SOLIDES)

A.18. DÉTERMINATION DE LA MASSE MOLÉCULAIRE MOYENNE EN NOMBRE ET DE LA DISTRIBUTION DES MASSES MOLÉCULAIRES DES POLYMÈRES

A.19. DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN POLYMÈRES DE FAIBLE MASSE MOLÉCULAIRE

A.20. COMPORTEMENT DE DISSOLUTION EXTRACTION DES POLYMÈRES DANS L'EAU

A.21. PROPRIÉTÉS COMBURANTES (LIQUIDES)

A.22. DIAMÈTRE MOYEN GÉOMÉTRIQUE PONDÉRÉ PAR LA LONGUEUR DES FIBRES

A.23. COEFFICIENT DE PARTAGE (1-OCTANOL/EAU): MÉTHODE DU BRASSAGE LENT

A.24. COEFFICIENT DE PARTAGE (N-OCTANOL/EAU), MÉTHODE HPLC (CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE)

A.25. CONSTANTE DE DISSOCIATION DANS L'EAU (MÉTHODE VOLUMÉTRIQUE — MÉTHODE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE — MÉTHODE CONDUCTIMÉTRIQUE)

▼B

A.1. TEMPÉRATURE DE FUSION/DE CONGÉLATION

1. MÉTHODE

La plupart des méthodes décrites se basent sur les lignes directrices de l'OCDE (1). Leurs principes fondamentaux sont décrits dans les références (2) et (3).

1.1. INTRODUCTION

Les méthodes et les appareils décrits ci-après permettent de déterminer la température de fusion des produits chimiques, quel que soit leur degré de pureté.

La sélection de la méthode dépend de la nature de la substance à tester. Par conséquent, le facteur limitant dépend du fait que la substance peut être facilement ou difficilement pulvérisable ou peut ne pas l'être du tout.

Pour certaines substances, il est préférable de déterminer la température de congélation ou de solidification. C'est pourquoi les normes de ces déterminations figurent également dans cette méthode.

Lorsqu'il est difficile, du fait de certaines propriétés de la substance, de mesurer les paramètres cités ci-dessus, il peut être approprié de rechercher un point d'écoulement.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

La température de fusion est définie comme étant la température à laquelle se produit la transition de phase de l'état solide à l'état liquide, à la pression atmosphérique. Idéalement, cette température correspond à la température de congélation.

Étant donné que la transition de phase de nombreuses substances a lieu dans un certain intervalle de température, celle-ci est souvent décrite comme un intervalle de fusion.

Conversion des unités (K en ^{o}C)

$t = T - 273{,}15$

t: température Celsius en degrés Celsius (^{o}C)

T: température thermodynamique en Kelvin (K)

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Il n'est pas nécessaire d'employer des substances de référence dans tous les cas où l'on étudie une nouvelle substance. Elles devraient servir en premier lieu à vérifier de temps à autre la fiabilité de la méthode et à permettre les comparaisons avec les résultats obtenus avec d'autres méthodes.

Certaines substances d'étalonnage sont énumérées dans la référence (4).

▼B

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La température (intervalle de température) de la phase de transition de l'état solide, à l'état liquide, ou de l'état liquide à l'état solide, est déterminée. En pratique, les températures du début et de la fin de la fusion/congélation sont déterminées au cours du chauffage/refroidissement, à pression atmosphérique, de la substance à étudier. Cinq types de méthodes sont décrites; la méthode en tube capillaire, la méthode par bloc chauffant, la mesure de la température de congélation, les méthodes d'analyse thermique et la détermination du point d'écoulement (mise au point pour les huiles de pétroles).

Dans certains cas, il peut être commode de mesurer la température de congélation au lieu de la température de fusion.

1.4.1. **Méthode du tube capillaire**

1.4.1.1. *Dispositif de mesure de la température de fusion comportant un bain liquide*

Une petite quantité de substance finement broyée est placée dans un tube capillaire et tassée avec soin. Le tube est chauffé en même temps qu'un thermomètre dans le bain liquide et l'accroissement de température est ajusté à un peu moins d'1 K/mn pendant la fusion réelle. Les températures correspondant au début et à la fin de la fusion sont relevées.

1.4.1.2. *Dispositif de mesure de la température de fusion comportant un bloc métallique*

Le protocole est le même que celui décrit au paragraphe 1.4.1.1, si ce n'est que le tube capillaire et le thermomètre sont placés dans un bloc de métal chauffé et observés à travers des ouvertures aménagées dans ce dernier.

1.4.1.3. *Détection photo-électrique*

L'échantillon contenu dans le tube capillaire est chauffé automatiquement dans un cylindre métallique. Par une ouverture aménagée dans celui-ci, un faisceau de lumière est envoyé à travers la substance à tester vers une cellule photo-électrique soigneusement étalonnée. Au moment de la fusion, les propriétés optiques de la plupart des substances sont modifiées en ce sens que l'opacité fait place à la transparence. De ce fait, l'intensité de la lumière qui atteint la cellule photo-électrique augmente et envoie un signal d'arrêt à l'indicateur digital qui affiche la température d'un thermomètre à résistance de platine placé dans l'enceinte chauffante. Cette méthode n'est pas applicable à certaines substances fortement colorées.

1.4.2. **Méthodes avec bloc chauffant**

1.4.2.1. *Méthode au banc chauffant de Kofler*

Le banc chauffant de Kofler est composé de deux pièces de métal de conductivité thermique différente, qui sont chauffées électriquement. Il est construit de façon à ce que le gradient de température soit *quasi* linéaire sur toute sa longueur. La température de ce banc chauffant peut varier de 283 à 573 K grâce à un dispositif de lecture de la température comprenant un curseur avec un index et une réglette graduée, spécialement conçus pour le banc en question. Pour déterminer une température de fusion, une fine couche de substance est directement déposée sur la surface du banc. En quelques secondes, il se forme une ligne fine de séparation entre la phase fluide et la phase solide. La température à la hauteur de cette ligne est lue en plaçant l'index face à cette dernière.

▼B

1.4.2.2. *Microscope à fusion*

Différents microscopes à platine chauffante sont utilisés pour déterminer des températures de fusion avec de très pentes quantités de substance. La température est généralement mesurée à l'aide d'un thermocouple sensible, mais parfois aussi à l'aide d'un thermomètre à mercure. Le dispositif type de mesure de la température de fusion grâce à un microscope à platine chauffante comporte une enceinte chauffante qui contient une platine métallique sur laquelle est posée une lame de verre destinée à recevoir l'échantillon. Le centre de la platine métallique est percé d'un trou permettant le passage de la lumière provenant du miroir éclairant le microscope. Lors de l'utilisation, l'enceinte est fermée à l'aide d'une plaque de verre pour empêcher la circulation d'air dans la région où se trouve l'échantillon.

Le chauffage de l'échantillon *est* réglé au moyen d'un rhéostat. Pour effectuer des mesures très précises sur des substances optiquement anisotropes, il est possible d'utiliser de la lumière polarisée.

1.4.2.3. *Méthode du ménisque*

Cette méthode s'applique spécialement aux polyamides.

La température à laquelle se déplace un ménisque d'huile de silicone, emprisonné entre une surface chauffée et une lamelle couvre-objet placée au-dessus de l'échantillon de polyamide à étudier, est déterminée visuellement.

1.4.3. **Méthode de détermination de la température de congélation**

L'échantillon est introduit dans un tube à essai spécial et placé dans un appareil permettant la détermination de la température de congélation. L'échantillon est agité doucement durant tout le refroidissement et la température est relevée à intervalles déterminés. Dès que quelques relevés indiquent une température constante, cette dernière est considérée comme la température de congélation (après correction de l'erreur relative au thermomètre).

Il convient d'éviter un refroidissement trop fort en maintenant un équilibre entre la phase liquide et la phase solide.

1.4.4. **Analyse thermique**

1.4.4.1. *Analyse thermique différentielle (ATD)*

Cette méthode consiste à enregistrer la différence de température entre la substance et la substance de référence en fonction de la température pendant que la substance et la substance de référence sont soumises à un programme contrôlé de variation de température. Lorsque l'échantillon subit une transition impliquant un changement d'enthalpie, ce changement est indiqué par un mouvement endothermique (fusion) ou exothermique (congélation) sur la ligne de base de l'enregistrement de la température.

▼B

1.4.4.2. *Analyse calorimétrique différentielle (ACD)*

Cette technique consiste à soumettre une substance et un produit de référence à un même programme de variation contrôlée de la température et à enregistrer la différence d'énergie absorbée par la substance et par le produit de référence, en fonction de la température. Cette énergie correspond à l'énergie nécessaire pour annuler la différence de température entre la substance et le matériel de référence, Lorsque l'échantillon subit une transition impliquant un changement d'enthalpie, celui-ci est indiqué par un mouvement endothermique (fusion) ou exothermique (congélation) sur la ligne de base de l'enregistrement du flux de chaleur.

1.4.5. **Point d'écoulement**

Cette méthode, mise au point pour les huiles de pétrole, s'applique aux substances huileuses dont la température de fusion est basse.

Après un chauffage préliminaire, l'échantillon est refroidi à une vitesse spécifique et son écoulement est observé à des intervalles de 3 K. La température la plus basse à laquelle on observe un mouvement de la substance est considérée comme le point d'écoulement.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

L'applicabilité et la précision des différentes méthodes utilisées pour déterminer la température de fusion/intervalle de fusion sont énumérées dans le tableau suivant.

TABLEAU: APPLICABILITÉ DES MÉTHODES

A. **Méthodes du tube capillaire**

Méthode de mesure	Substances pulvérisables	Substances difficilement pulvérisables	Gamme de températures	Précision approximative (1)	Norme existante
Dispositifs de mesure de la température de fusion comportant un bain de liquide	oui	seulement quelques unes	de 273 à 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Dispositifs de mesure de la température de fusion comportant un bloc métallique	oui	seulement quelques unes	de 293 à 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Détection photoélectrique	oui	plusieurs avec des dispositifs d'application	de 253 à 573 K	± 0,5 K	

(1) Valeur dépendante du type d'instrument et du degré de pureté de la substance.

▼B

B. **Méthodes utilisant une surface chauffée et méthode de mesure de la température de congélation**

Méthode de mesure	Substances pulvérisables	Substances difficilement pulvérisables	Gamme de températures	Précision approximative (1)	Norme existante
Banc chauffant de Kofler	oui	non	de 283 à > 573 K	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 345176
Microscope a fusion	oui	quelques-unes seulement	de 273 à > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Méthode du ménisque	non	spécifique aux polyamides	de 293 à > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Méthodes de mesure de la température de congélation	oui	oui	de 223 à 573 K	± 0,5 K	par ex. BS 4695

(1) Valeur dépendante du type d'instrument et du degré de pureté de la substance.

C. **Analyses thermiques**

Méthode de mesure	Substances pulvérisables	Substances difficilement pulvérisables	Gamme de températures	Précision approximative (1)	Norme existante
Analyse thermique différentielle	oui	oui	de 173 à 1 273 K	jusqu'à 600 K ± 0,5 K jusqu'à 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Analyse calorimétrique différentielle	oui	oui	de 173 à 1 273 K	jusqu'à 600 K ± 0,5 K jusqu'à 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) Valeur dépendante du type d'instrument et du degré de pureté de la substance.

D. **Point d'écoulement**

Méthode de mesure	Substances pulvérisables	Substances difficilement pulvérisables	Gamme de températures	Précision approximative (1)	Norme existante
Point d'écoulement	pour les huiles de pétrole et les substances huileuses	pour les huiles de pétrole etles substances huileuses	De 223 à 323 K	± 3,0 K	ASTM D 9766

(1) Valeur dépendante du type d'instrument et du degré de pureté de la substance.

1.6. DESCRIPTION DES MÉTHODES

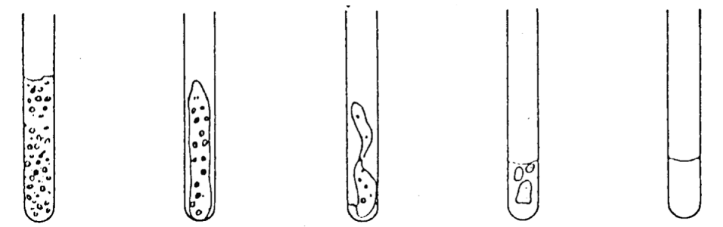
Les procédures de presque toutes les méthodes d'essai ont été décrites dans des normes internationales et nationales (voir annexe 1).

1.6.1. **Méthodes en tube capillaire**

Lorsqu'elles sont soumises à une élévation lente de la température, les substances finement pulvérisées montrent habituellement les stades de fusion représentés à la figure 1.

▼B

Figure 1



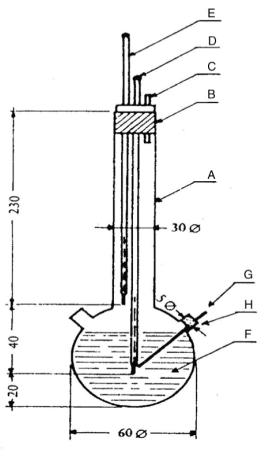
Stade A	(début de la fusion) : de fines gouttes adhèrent uniformément à la paroi intérieure du tube capillaire.
Stade B	un espace apparaît entre l'échantillon et la paroi intérieure, en raison de la rétraction du produit en fusion.
Stade C	l'échantillon rétracté commence à s'affaisser et à se liquéfier.
Stade D	un ménisque complet se forme à la surface, mais une partie importante de l'échantillon reste à l'état solide.
Stade E	(fin de la fusion) : il n'y a plus aucune particule solide.

Durant la détermination de la température de fusion, il y a lieu de relever la température au début et à la fin de la fusion.

1.6.1.1. *Dispositif de mesure de la température de fusion comportant un bain liquide*

La figure 2 décrit un type d'appareil de mesure de la température de fusion standardisé (JIS K 0064); l'appareil est en verre et toutes les spécifications sont exprimées en millimètres.

Figure 2



A: Ballon de mesure
B: Bouchon
C: Tube d'aération
D: Thermomètre
E: Thermomètre auxiliaire
F: Bain liquide
G: Tube capillaire en verre (80 à 100 mm de longueur, 1 mm ± 0,2 mm de diamètre intérieur et 0,2 à 0,3 mm d'épaisseur de paroi)
H: Tube latéral

▼B

Bain liquide:

Il convient de choisir un liquide approprié en fonction de la température de fusion à déterminer; on utilisera, par exemple de la paraffine liquide pour des températures de fusion ne dépassant pas 473 K et de l'huile de silicone pour les températures de fusion ne dépassant pas 573 K.

Pour les températures de fusion dépassant 523 K, un mélange composé de trois parties d'acide sulfurique et de deux parties de sulfate de potassium (en rapport de masse) peut être utilisé. Il convient de prendre des précautions appropriées pour utiliser un mélange de ce type.

Thermomètre:

Seuls peuvent être utilisés les thermomètres qui répondent aux exigences des normes suivantes ou de leurs équivalents:

ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

Procédé:

La substance sèche est finement broyée dans un mortier et introduite dans un tube capillaire scellé à une extrémité, la hauteur du remplissage étant fixée à environ 3 mm après tassement. Pour obtenir un échantillon uniformément tassé, il faut laisser tomber le tube capillaire d'une hauteur d'environ 700 mm à l'intérieur d'un tube de verre posé verticalement sur un verre de montre.

Le tube capillaire rempli est placé dans le bain de telle sorte que la partie centrale du réservoir à mercure du thermomètre soit en contact avec la partie du tube capillaire où se trouve l'échantillon. En général, le tube capillaire est introduit dans l'appareil au moment où le bain est à environ 10 K en dessous de la température de fusion.

Le chauffage du bain est réglé pour que l'accroissement de température soit d'environ 3 K par minute. Le liquide doit être agité. À environ 10 K en dessous de la température de fusion attendue, l'accroissement de température est réglé à un maximum de 1 K par minute.

Calcul:

Le calcul de la température de fusion s'effectue au moyen de la formule suivante:

$$T = T_D + 0{,}00016(T_D - T_E)n$$

où

T = température de fusion corrigée, exprimée en K

T_D = température lue sur le thermomètre D, exprimée en K

T_E = température lue sur le thermomètre E, exprimée en K

n = nombre de graduations de la colonne de mercure sur la tige émergente du thermomètre D.

1.6.1.2. *Dispositif de mesure de la température de fusion comportant un bloc métallique*

Appareil:

L'appareil comprend:

— un bloc métallique cylindrique, dont la partie supérieure est creuse et forme une enceinte (voir figure 3),

— un bouchon métallique, percé de deux ou plusieurs trous, permettant l'introduction des tubes dans le bloc métallique,

▼B

— un système de chauffage du bloc métallique, qui peut être constitué d'une résistance électrique dans le bloc,

— un rhéostat pour régler la puissance dans le cas d'un chauffage électrique,

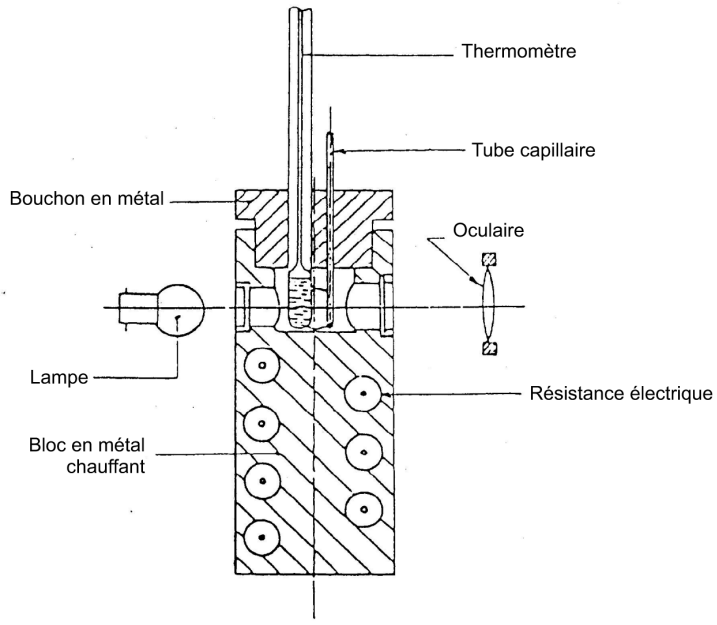
— quatre fenêtres en verre résistant à la chaleur, percées dans les parois latérales de l'enceinte, en position diamétralement opposée. Un oculaire permettant d'observer le tube capillaire est installé en face d'une de ces fenêtres. Les trois autres fenêtres permettent d'éclairer l'intérieur de l'enceinte à l'aide de lampes,

— un tube capillaire, en verre résistant à la chaleur, scellé à une extrémité (voir point 1.6.1.1).

Thermomètre:

Voir nonnes mentionnées au point 1.6.1.1. Des instruments de mesure thermoélectriques de précision équivalente sont aussi utilisables.

Figure 3



1.6.1.3. *Détection photo-électrique*

Appareil et procédé:

L'appareil consiste en une enceinte métallique pourvue d'un système de chauffage automatisé. Trois tubes capillaires sont remplis comme prévu au point 1.6.1.1 et placés dans le four.

▼B

Plusieurs programmes d'accroissement linéaire de la température permettant d'étalonner l'appareil. L'accroissement de température approprié est électriquement réglé à un taux constant et linéaire présélectionné. Des enregistreurs indiquent la température réelle du four et la température de la substance dans les tubes capillaires.

1.6.2 **Méthode de la surface chauffée**

1.6.2.1 *Banc chauffant de Kofler*

Voir annexe.

1.6.2.2 *Microscope à fusion*

Voir annexe.

1.6.2.3 *Méthode du ménisque (polyamides)*

Voir annexe.

Aux alentours de la température de fusion, l'accroissement de la température doit être inférieur à 1 K/mn.

1.6.3. **Méthodes de détermination de la température de congélation.**

Voir annexe.

1.6.4. **Analyses thermiques**

1.6.4.1. *Analyse thermique différentielle*

Voir annexe

1.6.4.2. *Analyse calorimétrique différentielle*

Voir annexe.

1.6.5. **Détermination du point d'écoulement**

Voir annexe.

2. **DONNÉES**

La correction du thermomètre s'impose dans certains cas.

3. **PROCÈS-VERBAL D'ESSAI**

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

— la méthode utilisée,

— les spécifications précises de la substance (identité et impuretés) et, éventuellement, l'étape de purification préliminaire,

— une estimation de la précision.

La température de fusion indiquée dans le rapport est donnée par la moyenne de deux mesures au moins qui ne dépassent pas les limites de la précision estimée (voir tableau).

▼B

Si la différence de température entre le début et la fin de la fusion se trouve dans les limites de précision de la méthode, la température relevée au stade final de la fusion est considérée comme la température de fusion; sinon les deux températures sont indiquées.

Si la substance se décompose ou se sublime avant que la température de fusion soit atteinte, la température à laquelle cela se produit doit être mentionnée.

Toutes les informations et observations pertinentes pour l'interprétation des résultats doivent être mentionnées, en particulier les impuretés et l'état physique de la substance.

4. **RÉFÉRENCES**

1) OCDE, Paris, 1981, Ligne directrice n° 102, décision du Conseil C(81) 30 final.

2) UIPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. *Experimental thermodynamics*, Butterworths, London, 1975, vol. II, 803-834.

3) R. Weissberger ed., *Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry*, 3rd ed, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.

4) UICPA, *Mesures physico-chimiques: Catalogue de substances de référence pour les laboratoires nationaux, Chimie pure et appliquée*, 1976, vol. 48, 505-515.

▼B

Annexe

Pour plus de détails, on peut consulter par exemple les normes suivantes.

1. **Méthodes du tube capillaire**

1.1. Dispositif de mesure de la température de fusion comportant un bain liquide

ASTM E 324-69	Standard test method for relative initial and final melting points and melting range of organic chemicals
BS 4634	Method for the determination of melting point and/or melting range
DIN 53181	Bestimmung der Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren.
JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products.

1.2. Dispositif de mesure de la température de fusion comportant un bloc métallique

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelz-temperatur von teilkristallinen Kunsts-toffen
ISO 1218 (E)	Plastics — polyamides — determina-tion of «melting point»

2. **Méthodes du bloc chauffant**

2.1. Banc chauffant de Kofler

ANSI/ASTM D 3451-76	Standard recommanded practices for testing polymeric powder coatings

2.2. Microscope à fusion

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelz-temperatur von reilkristallinen Kunsrs-toffen.

2.3. Méthode du ménisque (polyamides)

ISO 1218 (E)	Plastics — polyamides — determina-tion of «melting point»

▼B

ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resine injection moulding and extrusion materials
NF T 51-050	Résines de polyamides. Détermination du «point de fusion». Méthode du ménisque.

3. **Méthodes de détermination de la température de congélation**

BS 4633	Method for the determination of crystallizing point
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of Petroleum Wax (cooling curve)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
ISO 2207	Cires de pétrole: détermination de la température de figeage.
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congélation)
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point.

4. **Analyse thermique**

4.1. Analyse thermique différentielle

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis

▼B

ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

4.2. Analyse calorimétrique différentielle

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

5. **Détermination du point d'écoulement**

NBN 52014	Échantillonnage et analyse des produits du pétrole: point de trouble et point d'écoulement limite — Monsterneming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt
ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroieum oils
ISO 3016	Petroleum oils — Determination of pour point.

▼B

A.2. TEMPÉRATURE D'ÉBULLITION

1. MÉTHODES

La plupart des méthodes décrites se fondent sur les lignes directrices de l'OCDE (1). Les principes fondamentaux sont décrits dans les références (2) et (3).

1.1. INTRODUCTION

Les méthodes et dispositifs décrits ici peuvent être appliqués aux substances liquides et à température de fusion faible, à condition qu'elles ne subissent pas de réaction chimique au-dessous de la température d'ébullition (par exemple, auto-oxydation, réarrangement, dégradation, etc.). Les méthodes s'appliquent aux substances liquides pures et impures.

L'importance donnée aux méthodes recourant à la détection photoélectrique et à l'analyse thermique est due au fait que ces méthodes permettent de déterminer non seulement la température de fusion, mais également la température d'ébullition. De surcroît, les mesures peuvent être effectuées de manière automatique.

La «méthode dynamique» a l'avantage de pouvoir être également utilisée pour la détermination de la pression de vapeur et il n'est pas nécessaire de ramener la température d'ébullition aux conditions normales de pression (101,325 kPa), puisque la pression normale peut être maintenue au cours de la mesure à l'aide d'un manostat.

Observations:

L'influence des impuretés sur la détermination de la température d'ébullition dépend beaucoup de la nature de l'impureté. Si l'échantillon contient des impuretés volatiles, susceptibles d'avoir une incidence sur les résultats, il convient de purifier la substance.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

La température d'ébullition normale est définie comme la température à laquelle la pression de vapeur d'un liquide s'élève à 101,325 kPa.

Si la température d'ébullition n'est pas mesurée à la pression atmosphérique normale, la dépendance de la pression de vapeur vis-à-vis de la température peut être décrite à l'aide de l'équation de Clausius-Clapeyron:

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2{,}3\ RT} + constante$$

où:

p = pression de vapeur de la substance exprimée en pascal

ΔH_v = chaleur de vaporisation en J mol^{-1}

R = constante molaire des gaz parfaits = 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = température thermodynamique exprimée en K

La température d'ébullition est établie en tenant compte de la pression ambiante au moment de la mesure.

▼B

Conversions

Pression (unité: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(l'utilisation du «bar» est toujours permise mais non recommandée);

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(l'utilisation des unités «mm Hg» et «Torr» n'est pas permise);

1 atm = atmosphère standard = 101,325 Pa

(l'utilisation de l'unité «atm» n'est pas permise).

Température (unité: K)

t = T - 273,15

t: température Celsius, exprimée en degré Celsius (^{o}C)

T: température thermodynamique, exprimée en kelvin (K)

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

II n'est pas nécessaire d'utiliser des substances de référence dans tous les cas où l'on étudie une nouvelle substance. Ces substances de référence doivent servir en premier lieu à vérifier la fiabilité de la méthode de temps à autre et à permettre la comparaison avec les résultats obtenus à l'aide d'autres méthodes.

Certaines substances d'étalonnage figurent dans les méthodes énumérées dans l'annexe.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Cinq méthodes de détermination de la température d'ébullition (intervalle d'ébullition) sont fondées sur la mesure de la température d'ébullition, deux autres sont fondées sur une analyse thermique.

1.4.1. **Méthode de l'ébulliomètre**

Bien que les ébulliomètres aient été à l'origine mis au point pour la détermination du poids moléculaire par élévation de la température d'ébullition, ils se prêtent également aux mesures exactes de la température d'ébullition. Un appareil très simple est décrit dans la norme ASTM D 1120-72 (voir annexe). Dans cet appareil, le liquide est chauffé jusqu'à ébullition à la pression atmosphérique (conditions d'équilibre).

1.4.2. **Méthode dynamique**

Cette méthode comporte la mesure de la température de recondensation de la vapeur à l'aide d'un thermomètre approprié placé dans le reflux pendant l'ébullition. La pression peut être modifiée dans cette méthode.

1.4.3. **Méthode par distillation à la température d'ébullition**

Cette méthode comporte la distillation du liquide, la mesure de la température de recondensation de la vapeur et la détermination de la quantité de distillat.

▼B

1.4.4. **Méthode selon Siwoloboff**

Un échantillon est chauffé dans un tube à essai, qui est immergé dans le liquide contenu dans un bain chauffant. Un capillaire scellé, contenant une bulle d'air dans sa partie inférieure, est plongé dans le tube à essai.

1.4.5. **Détection photoélectrique**

Suivant le principe de Siwoloboff, l'ascension des bulles permet une mesure photoélectrique automatique.

1.4.6. **Analyse thermique différentielle**

Cette technique permet d'enregistrer la différence de température entre la substance et une substance de référence, en fonction de la température, pendant que la substance et la substance de référence sont soumises au même programme de variation contrôlée de la température. Lorsque l'échantillon subit une transition impliquant un changement d'enthalpie, celui-ci est indiqué par un mouvement endothermique (ébullition) sur la ligne de base de l'enregistrement de la température.

1.4.7. **Analyse calorimétrique différentielle**

Cette technique permet d'enregistrer la différence entre l'énergie absorbée par une substance et par un produit de référence, en fonction de la température, alors qu'ils sont soumis au même programme de variation contrôlée de la température. Cette énergie correspond à l'énergie nécessaire pour annuler la différence de température entre la substance et le matériel de référence. Lorsque l'échantillon subit une transition impliquant un changement d'enthalpie, celui-ci est indiqué par un mouvement endothermique (ébullition) sur la ligne de base de l'enregistrement du flux de chaleur.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

L'applicabilité et la précision des différentes méthodes utilisées pour déterminer la température d'ébullition/intervalle d'ébullition sont indiquées dans le tableau 1.

Tableau 1

Comparaison des méthodes

Méthode de mesure	Précision estimée	Norme existante
Ébulliomètre	± 1,4 K (jusqu'à 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (jusqu'à 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Méthode dynamique	± 0,5 K (jusqu'à 600 K) (2)	
Méthode de distillation (intervalle d'ébullition)	± 0,5 K (jusqu'à 600 K)	ISO/R918, DIN 53171, BS 4591/71
Méthode selon Siwoloboff	± 2 K (jusqu'à 600 K) (2)	
Détection photoélectrique	± 0,3 K (à 373 K) (2)	
Calorimétrie	± 0,5 K (jusqu'à 600 K) ± 2,0 K (jusqu'à 1 273 K)	ASTM E 537-76
Analyse calorimétrique différentielle	± 0,5 K (jusqu'à 600 K) ± 2,0 K (jusqu'à 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Cette précision n'est valable que pour les appareils simples comme celui décrit dans la norme ASTM D 1120-72; il est possible de l'améliorer en utilisant des ébulliomètres plus perfectionnés.
(2) Valable seulement pour les substances pures. Dans le cas contraire, son utilisation doit être justifiée.

▼B

1.6. DESCRIPTION DES MÉTHODES

Les procédures de certaines méthodes d'essai ont été décrites dans des normes internationales et nationales (voir annexe).

1.6.1. **Ébulliomètre**

Voir annexe.

1.6.2. **Méthode dynamique**

Voir méthode d'essai A.4 pour la détermination de la pression de vapeur.

La température d'ébullition est enregistrée à une pression de 101,325 kPa.

1.6.3. **Méthode de distillation (intervalle d'ébullition)**

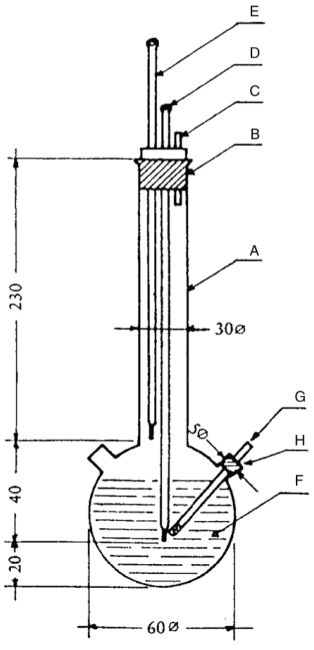
Voir annexe.

1.6.4. **Méthode selon Siwoloboff**

L'échantillon est introduit dans un tube à essai ayant environ 5 mm de diamètre et chauffé dans un appareil servant à la détermination de la température de fusion (figure 1).

La figure 1 donne un exemple d'appareil normalisé servant à déterminer la température de fusion et la température d'ébullition (JIS K 0064) (l'appareil est en verre et toutes les spécifications sont données en millimètres).

Figure 1



A: Ballon de mesure
B: Bouchon
C: Tube d'aération
D: Thermomètre
E: Thermomètre auxiliaire
F: Bain de liquide
G: Tube à essais (diamètre extérieur de 5 mm au maximum), contenant un tube capillaire, d'environ 100 mm de longueur, 1 mm de diamètre interne et 0,2 à 0,3 mm d'épaisseur de paroi
H: Tube latéral

Un tube capillaire (capillaire d'ébullition) scellé à environ 1 cm au-dessus de son extrémité inférieure est plongé dans le tube à essai contenant la substance à étudier. La partie scellée du capillaire doit se trouver au-dessous de la surface du liquide. Le tube à essai contenant le capillaire doit être attaché au thermomètre avec un élastique ou fixé au moyen d'un support latéral (voir figure 2).

▼B

Figure 2

Méthode selon Siwoloboff

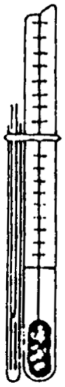
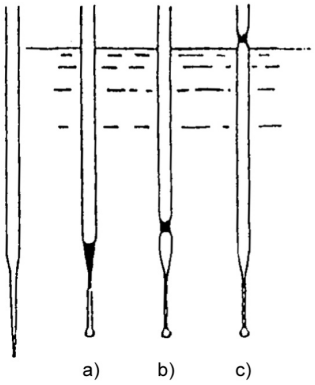


Figure 3

Méthode modifiée



Le liquide du bain est choisi en fonction de la température d'ébullition. Pour des températures allant jusqu'à 573 K, on peut utiliser de l'huile de silicone. La paraffine liquide ne convient que pour des températures inférieures à 473 K. Au départ, le chauffage du bain doit être réglé de façon à obtenir un accroissement de température de 3 K/min. Le liquide du bain doit être agité. À environ 10 K au-dessous de la température d'ébullition présumée, le chauffage est réduit de telle sorte que l'accroissement de température ne dépasse pas 1 K par minute. À l'approche de la température d'ébullition, des bulles commencent à s'échapper rapidement du capillaire à l'ébullition.

La température d'ébullition est déterminée par la température à laquelle, lors d'un refroidissement momentané, le chapelet de bulles s'interrompt et le liquide s'élève soudain dans le capillaire. La température relevée à ce moment précis correspond à la température d'ébullition de la substance.

Dans la méthode modifiée (figure 3), la température d'ébullition est déterminée dans un capillaire à température de fusion. L'extrémité de ce dernier est étirée en une fine pointe d'environ 2 centimètres de longueur (a) et une petite quantité de la substance à tester est aspirée à l'intérieur. La pointe est alors scellée en emprisonnant une petite bulle d'air. Lors du chauffage dans l'appareil servant à déterminer la température de fusion (b), la bulle d'air se dilate. La température d'ébullition correspond à la température à laquelle l'échantillon de la substance atteint le niveau de la surface du bain de liquide (c).

1.6.5. **Détection photoélectrique**

Un échantillon de la substance à tester est chauffé dans un tube capillaire placé à l'intérieur d'un bloc métallique chauffant.

Un faisceau de lumière est envoyé, par les ouvertures aménagées dans le bloc, à travers la substance vers une cellule photoélectrique étalonnée de façon précise.

Durant l'élévation de la température de l'échantillon, quelques bulles d'air s'échappent du capillaire d'ébullition. Lorsque la température d'ébullition est atteinte, le nombre de bulles augmente très fortement. La modification de l'intensité lumineuse qui s'ensuit est enregistrée par la cellule, qui envoie un signal d'arrêt à l'indicateur de température (thermomètre à résistance de platine placé dans le bloc).

Cette méthode est particulièrement utile parce qu'elle permet d'effectuer des déterminations au-dessous de la température ambiante jusqu'à 253,15 K (– 20 °C) sans aucune modification de l'appareil. L'instrument doit simplement être placé dans un bain réfrigérant.

▼B

1.6.6. **Analyse thermique**

1.6.6.1. *Analyse thermique différentielle*

Voir annexe.

1.6.6.2. *Analyse calorimétrique différentielle*

Voir annexe.

2. **DONNÉES**

Pour de faibles écarts par rapport à la pression normale (maximum ±5 kPa), les températures d'ébullition peuvent être ramenées à T_n par l'équation de Sidney Young:

$T_n = T + (f_T \times \Delta p)$

où:

Δp = $(101{,}325 - p)$ [attention au signe]

p = pression barométrique en kPa

f_T = vitesse de variation de la température d'ébullition avec la pression, en K/kPa

T = valeur mesurée de la température d'ébullition, en K

T_n = valeur corrigée de la température d'ébullition, en K, à la pression normale.

Les facteurs de correction de la température (f_T) et les équations de calcul des approximations figurent dans les normes internationales et nationales citées dans le texte (valable pour de nombreuses substances).

Par exemple, la méthode DIN 53171 donne les corrections pour les solvants contenus dans les peintures:

Tableau 2

Facteurs de correction de la température (f_T)

Température T (K)	Facteur de correction f_T (K/kPa)
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

▼B

3. **RÉSULTATS**

Le procès-verbal d'essais contiendra, si possible, les renseignements suivants:

— la méthode utilisée,

— les spécifications précises de la substance (identité et impuretés) et, éventuellement, l'étape de purification préliminaire,

— une estimation de la précision.

La température d'ébullition indiquée dans le procès-verbal est la moyenne d'au moins deux mesures qui se situent à l'intérieur des limites de précision estimées (tableau 1).

Les valeurs mesurées des températures d'ébullition ainsi que leurs moyennes doivent être indiquées et la (les) pression(s) à laquelle (auxquelles) ont été effectuées les mesures doit (doivent) être notée(s) en kPa. La pression doit de préférence être proche de la pression atmosphérique normale.

Toutes les informations et observations pertinentes pour l'interprétation des résultats doivent être fournies, notamment en ce qui concerne les impuretés et l'état physique de la substance.

4. **RÉFÉRENCES**

(1) OCDE, Paris, 1981, Ligne directrice n° 103, décision du Conseil C(81) 30 final.

(2) UICPA, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Expérimenta! thermodynamics, Buttenworths, London, 1975, vol. II.

(3) R. Weissberger éd.: Technique of organic chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. 1, Part I, Chapter VIII.

▼B

Annexe

Pour plus de détails techniques, on peut, par exemple, consulter les normes suivantes:

1. **Ébulliomètre**

ASTM D 1120-72	Standard test method for boiling point of engine anti-freezes

2. **Méthode de distillation (intervalle d'ébullition)**

ISO/R 918	Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range)
BS 4349/68	Method for determination of distillation of petroleum products
BS 4591/71	Method for the determination of distillation characteristics
DIN 53171	Losungsmittel fur Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation: détermination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. **Analyse thermique différentielle et analyse calorimétrique différentielle**

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

▼B

A.3. DENSITÉ RELATIVE

1. MÉTHODE

Les méthodes décrites se fondent sur les lignes directrices de l'OCDE (1). Les principes fondamentaux sont décrits dans la référence (2).

1.1. INTRODUCTION

Les méthodes de détermination de la densité relative décrites s'appliquent aux substances solides et liquides, quel que soit leur degré de pureté. Les diverses méthodes à appliquer sont énumérées dans le tableau 1.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

La densité relative D^{20}_4 des solides ou des liquides est le rapport entre la masse d'un volume de substance à tester, déterminée à 20 °C, et la masse du même volume d'eau, déterminée à 4 °C. La densité relative est un nombre sans dimension.

La masse volumique, P, d'une substance est le quotient de la masse, m, par son volume, v.

En unités SI, la masse volumique, P, est exprimée en kg/m^3.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE (1) (3)

Il n'est pas nécessaire d'employer des substances de référence dans tous les cas où l'on étudie une nouvelle substance. Elles devraient servir en premier lieu à vérifier de temps à autre la fiabilité de la méthode et à permettre les comparaisons avec les résultats obtenus avec d'autres méthodes.

1.4. PRINCIPE DES MÉTHODES

Quatre types de méthodes sont utilisés.

1.4.1. **Méthodes de flottabilité**

1.4.1.1 *Aréomètre* (pour les liquides)

On peut obtenir des mesures de densité suffisamment précises et rapides à l'aide d'aréomètres flottants qui permettent de déduire la densité d'un liquide à partir de la profondeur d'immersion repérée sur une échelle graduée.

1.4.1.2 *Balance hydrostatique* (pour les liquides et les solides)

La différence entre le poids d'un échantillon mesuré dans l'air et dans un liquide approprié (par exemple l'eau) peut servir à déterminer sa densité.

Dans le cas des solides, la densité mesurée n'est représentative que de l'échantillon utilisé. Pour déterminer la densité d'un liquide, on pèse un corps d'un volume v tout d'abord dans l'air, puis dans le liquide.

1.4.1.3 *Méthode du corps immergé* (pour les liquides) (4)

Dans cette méthode, la densité d'un liquide est déterminée à partir de la différence entre les résultats de la pesée du liquide avant et après immersion d'un corps de volume connu dans le liquide à étudier.

▼B

1.4.2. **Méthodes pycnométriques**

Pour les solides ou les liquides, on peut utiliser des pycnomètres de forme variée dont les volumes sont connus. La densité est calculée à partir de la différence de poids entre le pycnomètre plein et le pycnomètre vide, d'une part, et de son volume connu, d'autre part.

1.4.3. **Pycnomètre de comparaison à air** (pour les solides)

La densité d'un solide de forme quelconque peut être mesurée, à la température ambiante, à l'aide d'un pycnomètre de comparaison à gaz. Le volume d'une substance dans l'air ou dans un gaz inerte est mesuré dans une éprouvette graduée de volume variable. Pour le calcul de la densité, une mesure de masse est effectuée après la mesure du volume.

1.4.4. **Densimètre oscillant** (5) (6) (7)

La densité d'un liquide peut être mesurée à l'aide d'un densimètre oscillant. Un oscillateur mécanique, ayant la forme d'un U, vibre à une fréquence de résonance spécifique qui dépend de sa masse. L'introduction d'un échantillon modifie la fréquence de résonance de l'oscillateur. L'appareil doit être étalonné à l'aide de deux substances liquides de densités connues, choisies de préférence de façon à ce que leurs densités couvrent l'intervalle de mesure.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

L'applicabilité des différentes méthodes utilisées pour la détermination de la densité relative est représentée au tableau.

1.6. DESCRIPTION DES MÉTHODES

Les références des normes citées en exemple, qui peuvent être consultées pour obtenir des détails techniques supplémentaires, sont jointes à l'annexe.

Les mesures doivent être réalisées à 20 ^{o}C, et au moins en double.

2. **DONNÉES**

Voir normes.

3. **RÉSULTATS**

Le procès-verbal contiendra, si possible, les renseignements suivants:

— la méthode utilisée,

— les spécifications précises de la substance (identité et impuretés) et, éventuellement, l'étape de purification préliminaire.

La densité relative D_4^{20} doit être indiquée selon la définition figurant au point 1.2 en même temps que l'état physique de la substance examinée.

Toutes les informations et observations pertinentes pour l'interprétation des résultats doivent être mentionnées, en particulier en ce qui concerne les impuretés et l'état physique de la substance.

▼B

Tableau

Applicabilité des méthodes

Méthode de mesure	Densité		Viscosité dynamique maximale possible	Normes existantes
	solide	liquide		
1.4.1.1. Aréomètre		oui	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2. Balance hydrostatique				
a) solides	oui			ISO 1183 (A)
b) liquides		oui	5 Pa s	ISO 901 et 758
1.4.1.3. Méthode du corps immergé		oui	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Pycnomètre				ISO 3507
a) solides	oui			ISO 1183 (B), NF T 20-053
b) liquides		oui	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Pycnomètre de comparaison à air	oui			DIN 55990 partie 3, DIN 53243
1.4.4. Densimètre oscillant		oui	5 Pa s	

4. **RÉFÉRENCES**

(1) OCDE, Paris, 1981, Ligne directrice n° 109, décision du Conseil C(81) 30 final.

(2) R. Weissberger éd., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed, Chapter IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part 1.

(3) IUPAC, Recommended reference materials for realisation of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 508.

(4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol. 11, 427-430.

(5) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, 297-302.

(6) Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen — Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung — Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, 717-726.

(7) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, 253-255.

▼B

Annexe

Pour plus de détails techniques, on peut consulter, par exemple, les normes suivantes.

1. **Méthodes de flottabilité**

1.1. Aréomètre

DIN 12790, ISO 387	Hydrometer; general instructions
DIN 12791	Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use Part II: Density hydrometers; standardized sizes, designation Part III: Use and test
ISO 649-2	Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose
NF T 20-050	Produits chimiques à usage industriel — détermination de la densité des liquides — méthode aréométrique
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2. Balance hydrostatique

Pour les substances solides

ISO 1183	Method A: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
NF T 20-049	Produits chimiques à usage industriel — détermination de la densité des solides autres que les poudres et les produits alvéolaires — méthode de la balance hydrostatique
ASTM-D-792	Specific gravity and density of plastics by displacement
DIN 53479	Testing of plastics and elastomers; determination of density

Pour les substances liquides

ISO 901	ISO 758

▼B

DIN 51757	Testing of mineral oil and related materials; determination of density
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 et ASTM D 1481-62	
ASTM D 1298	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method
BS 4714	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

1.3. Méthode du corps immergé

DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar coating materials; determination of density; immersed body method

2. **Méthodes pycnométriques**

2.1. Pour les substances liquides

ISO 3507	Pycnometers
ISO 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 °C
DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)
DIN 12798	Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than l00,10 $^{-6}$ m^2 s $^{-1}$ at 15 °C
DIN 12800	Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than 100,10 $^{-6}$ m^2 s $^{-1}$ at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approxi-mately 1 bar at 90 °C)

▼B

DIN 12806	Hubbard pycnoter (for viscous liquids of all types which do not have a too high vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen)
DIN 12807	Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801)
DIN 12808	Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol-water mixture)
DIN 12809	Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube (for liquids which are not too viscous)
DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; détermination of density by pycnometer
DIN 51757	Point 7: testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 297	Section 15: Rubber products -chemical analysis
ASTM D 2111	(Method C: Halogenated organic compounds)
BS 4699	Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method)
BS 5903	Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary-stoppered pycnometer method
NF T 20-053	Produits chimiques à usage industriel — détermination de la densité des solides en poudre et des liquides — méthode pycnométrique

▼B

2.2. Pour les substances solides

ISO 1183	Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
NF T 20-053	Produits chimiques à usage industriel — détermination de la densité des solides en poudre et des liquides — méthode pycnométrique
DIN 19683	Determination of the density of soils

3. **Pycnomètre de comparaison à air**

DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige polymere; Prüfung

▼**M1**

A.4. **PRESSION DE VAPEUR**

1. **MÉTHODE**

Cette méthode est équivalente à la ligne directrice TG 104 (2004) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

Cette version révisée de la méthode A.4(1) comprend une technique supplémentaire d'effusion par thermogravimétrie isotherme, conçue pour les substances à très faible pression de vapeur (jusqu'à 10^{-10} Pa). Compte tenu des besoins en méthodes, en particulier pour les substances à faible pression de vapeur, les autres protocoles de cette version sont réévalués en ce qui concerne les autres domaines d'application.

À l'équilibre thermodynamique, la pression de vapeur d'une substance pure ne dépend que de la température. Les principes fondamentaux sont énoncés dans les références (2) et (3).

Aucune méthode de mesure n'est applicable à toute la gamme de pressions de vapeur comprises entre moins de 10^{-10} Pa et 10^5 Pa. Le présent document présente huit méthodes applicables dans différentes gammes de pression de vapeur. Le tableau 1 compare ces différentes méthodes quant à leur application et à la gamme de mesure. Ces méthodes ne conviennent qu'aux substances qui ne se décomposent pas dans les conditions de l'essai. Il est également possible d'estimer la pression de vapeur lorsque les méthodes expérimentales ne peuvent être employées pour des raisons techniques; une méthode d'estimation est recommandée dans l'appendice.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

La pression de vapeur d'une substance est définie comme la pression de saturation régnant au-dessus d'une substance solide ou liquide.

L'unité SI de pression à utiliser est le pascal (Pa). Les anciennes unités de pression se convertissent comme suit:

1 torr	=	1 mm Hg	=	$1{,}333 \times 10^2$ Pa
1 atmosphère	=	$1{,}013 \times 10^5$ Pa		
1 bar	=	10^5 Pa		

L'unité SI de température est le kelvin (K). La conversion des degrés Celsius en kelvins obéit à la formule suivante:

$$T = t + 273{,}15$$

où T est la température thermodynamique exprimée en kelvins et t représente la température en degrés Celsius.

▼**M1**

Tableau 1

Méthode de mesure	Substances		Répétabilité estimée	Reproductibilité estimée	Gamme recommandée
	Solide	Liquide			
Méthode dynamique	à bas point de fusion	oui	jusqu'à 25 % 1 à 5 %	jusqu'à 25 % 1 à 5 %	10^3 Pa à 2. 10^3 Pa 2.10^3 Pa à 10^5 Pa
Méthode statique	oui	oui	5 à 10 %	5 à 10 %	10 Pa à 10^5 Pa 10^{-2} Pa à 10^5 Pa (1)
Méthode de l'isoténiscope	oui	oui	5 à 10 %	5 à 10 %	10^2 Pa à 10^5 Pa
Méthode d'effusion: balance de pression de vapeur	oui	oui	5 à 20 %	jusqu'à 50 %	10^{-3} à 1 Pa
Méthode d'effusion: cellule de Knudsen	oui	oui	10 à 30 %	—	10^{-10} à 1 P
Méthode d'effusion: thermogravimétrie isotherme	oui	oui	5 à 30 %	jusqu'à 50 %	10^{-10} à 1 Pa
Méthode par saturation des gaz	oui	oui	10 à 30 %	jusqu'à 50 %	10^{-10} à 10^3 Pa
Méthode de la jauge à rotor	oui	oui	10 à 20 %	—	10^{-4} à 0,5 Pa

(1) Lorsqu'on utilise un manomètre à capacitance.

1.3. PRINCIPE DE L'ESSAI

En général, la pression de vapeur est déterminée à différentes températures. À l'intérieur d'un intervalle de température limité, le logarithme de la pression de vapeur d'une substance pure est une fonction linéaire de l'inverse de la température thermodynamique, suivant la forme simplifiée de l'équation de Clapeyron-Clausius:

$$\log p = \frac{\Delta Hv}{2{,}3RT} + constante$$

où:

p = pression de vapeur de la substance en pascals

ΔHv = chaleur de vaporisation en J mol^{-1}

R = constante molaire des gaz parfaits 8,314 J $mol^{-1}K^{-1}$

T = température exprimée en kelvins (K)

▼M1

1.4. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Il n'est pas nécessaire de recourir à des substances de référence. Elles servent surtout à vérifier la fiabilité d'une méthode de temps à autre et à comparer les résultats obtenus par différentes méthodes.

1.5. DESCRIPTION DES MÉTHODES

1.5.1. **Méthode dynamique (méthode de Cottrell)**

1.5.1.1. *Principe*

La pression de vapeur est déterminée par la mesure de la température d'ébullition de la substance à différentes pressions prédéfinies, comprises approximativement entre 10^3 et 10^5 Pa. Cette méthode est aussi recommandée pour la détermination du point d'ébullition et peut être utilisée à cette fin jusqu'à 600 K. En raison de la pression hydrostatique de la colonne de liquide, les températures d'ébullition des liquides sont environ 0,1 °C plus élevées à une profondeur de 3 à 4 cm qu'à la surface. Dans la méthode de Cottrell (4), le thermomètre est placé dans la vapeur située au-dessus de la surface du liquide et le dispositif de pompage est conçu pour que le liquide en ébullition mouille constamment le réservoir du thermomètre. Une fine couche de liquide en équilibre avec la vapeur à la pression atmosphérique recouvre le réservoir. Le thermomètre affiche donc le point d'ébullition réel, sans être affecté par la surchauffe ou la pression hydrostatique. La pompe employée à l'origine par Cottrell est représentée à la figure 1. Le tube A contient le liquide en ébullition. Un fil de platine B scellé au fond favorise l'uniformité de l'ébullition. Le tube latéral C est relié à un condenseur, et l'enveloppe D empêche le condensat froid d'atteindre le thermomètre E. Lorsque le liquide présent dans le tube A bout, des bulles et du liquide captés par l'entonnoir sont envoyés sur le réservoir du thermomètre par les deux branches de la pompe F.

Figure 1

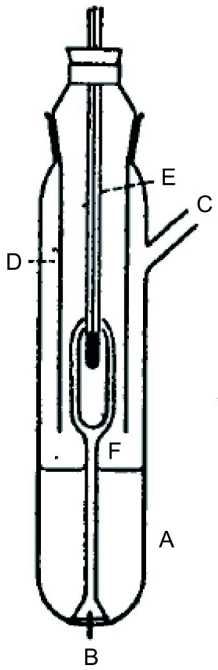
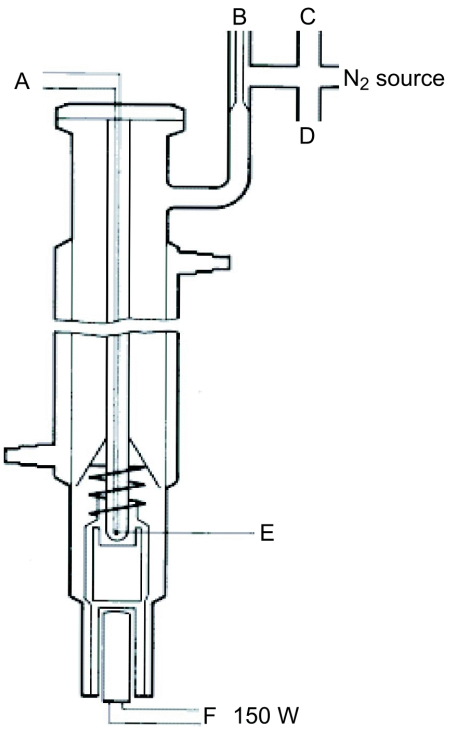


Figure 2



▼**M1**

Pompe de Cottrell (4)

A: thermocouple

B: volume vide tampon

C: jauge de pression

D: vide

E: point de mesure

F: élément chauffant (puissance environ 150 W)

1.5.1.2. *Appareillage*

Un appareil de grande précision, faisant appel au principe de Cottrell, est schématisé à la figure 2. Il se compose d'un tube dont la partie inférieure est dévolue à l'ébullition, équipé d'un réfrigérant dans sa partie médiane, ainsi que d'un orifice d'évacuation et d'un joint plat rodé dans sa partie supérieure. La pompe de Cottrell est montée dans la partie où siège l'ébullition, partie chauffée par une cartouche électrique. La température est mesurée au moyen d'un thermocouple à enveloppe ou d'un thermomètre à résistance, introduits dans le joint plat situé dans la partie supérieure. L'orifice d'évacuation est relié au système de régulation de la pression. Ce dernier se compose d'une pompe à vide, d'un volume tampon, d'un manostat qui régule la pression en modulant l'arrivée d'azote et d'un manomètre.

1.5.1.3. *Mode opératoire*

La substance est introduite dans la partie où a lieu l'ébullition. Les solides non pulvérulents peuvent poser des problèmes qui sont parfois résolus en chauffant la gaine de refroidissement. L'appareil est fermé avec le joint plat et la substance est dégazée. Cette méthode ne convient pas aux substances moussantes.

La plus basse des pressions souhaitées est alors établie et le chauffage est mis en marche; au même moment, le capteur de température est connecté à un enregistreur.

L'équilibre est atteint lorsque la température d'ébullition enregistrée demeure constante à pression constante. Il faut prendre particulièrement soin d'éviter les soubresauts pendant l'ébullition. En outre, la condensation sur le réfrigérant doit être complète. Lorsqu'on détermine la pression de vapeur de solides à bas point de fusion, il faut veiller à ce que le condenseur ne s'obstrue pas.

Ce point d'équilibre étant enregistré, on règle la pression sur une valeur plus élevée. Le processus se poursuit de la même manière jusqu'à ce qu'une pression de 10^5 Pa soit atteinte (environ 5 à 10 points de mesure au total). Les mesures seront répétées, à titre de vérification, avec des pressions décroissantes.

1.5.2. **Méthode statique**

1.5.2.1. *Principe*

Dans la méthode statique (5), la pression de vapeur à l'équilibre thermodynamique est déterminée à une température spécifiée. Cette méthode convient pour des substances et des mélanges liquides ou solides, dans la gamme comprise entre 10^{-1} et 10^5 Pa et, avec certaines précautions, dans la gamme de 1 à 10 Pa.

▼**M1**

1.5.2.2. *Appareillage*

Le dispositif comporte un bain à température constante (précision de ± 0,2 K), un récipient pour l'échantillon relié à une ligne de vide, un manomètre et un système de régulation de la pression. Le récipient contenant l'échantillon (figure 3a) est connecté à la ligne de vide par l'intermédiaire d'un robinet et d'un manomètre différentiel (tube en U rempli d'un liquide manométrique approprié) qui sert à indiquer le zéro. Comme liquide manométrique, on utilise du mercure, des silicones et des phtalates, suivant la gamme de pression et le comportement chimique de la substance d'essai. Toutefois, l'utilisation du mercure est à éviter autant que possible pour ne pas nuire à l'environnement. La substance d'essai ne doit pas réagir avec le fluide du tube en U ni s'y dissoudre notablement. Le tube en U peut être remplacé par une jauge de pression (figure 3b). Pour le manomètre, le mercure peut être utilisé dans la gamme comprise entre la pression normale et 10^2 Pa, tandis que les huiles de silicone et les phtalates conviennent aux pressions inférieures à 10^2 Pa et jusqu'à 10 Pa. D'autres jauges de pression sont utilisables en dessous de 10^2 Pa, et les manomètres à membrane chauffable peuvent même être employés en dessous de 10^{-1} Pa. La température est mesurée sur la paroi extérieure du récipient contenant l'échantillon ou dans le récipient lui-même.

1.5.2.3. *Mode opératoire*

Le tube en U de l'appareil décrit à la figure 3a est rempli avec le liquide choisi, qui doit être dégazé à haute température avant que les mesures soient commencées. La substance d'essai est introduite dans l'appareil et dégazée à température réduite. Dans le cas d'un échantillon à plusieurs composants, la température doit être suffisamment basse pour ne pas altérer la composition du mélange. Une agitation permettra d'atteindre l'équilibre plus rapidement. L'échantillon peut être refroidi avec de l'azote liquide ou de la neige carbonique, mais il convient d'éviter soigneusement la condensation de l'air ou du fluide de la pompe. On ouvre le robinet à vide au-dessus du récipient contenant l'échantillon afin de pratiquer une aspiration pendant plusieurs minutes pour éliminer l'air. Si nécessaire, le dégazage est répété plusieurs fois.

Figure 3a

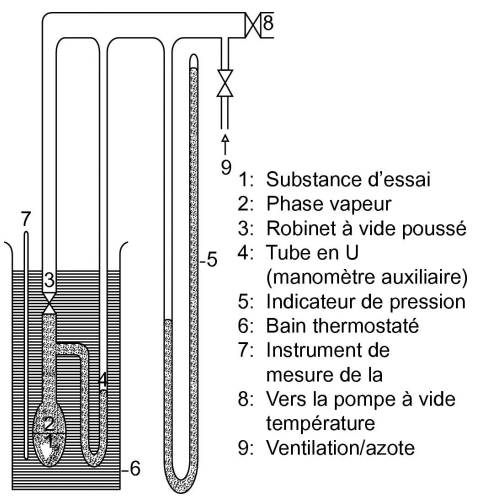
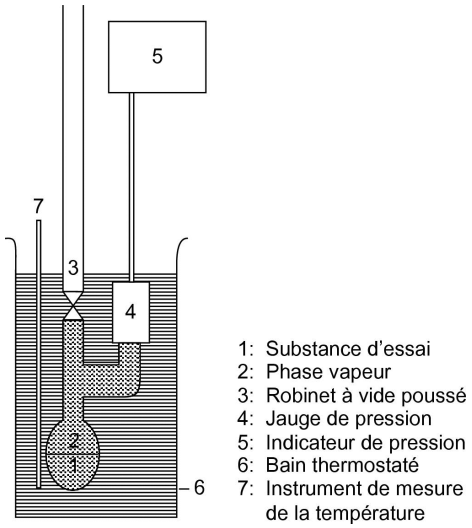


Figure 3b



▼**M1**

Lorsque l'échantillon est chauffé avec le robinet à vide fermé, la pression de vapeur augmente, ce qui modifie l'équilibre du fluide dans le tube en U. On compense ce changement en injectant de l'azote ou de l'air dans l'appareil jusqu'à ce que le manomètre différentiel indique à nouveau zéro. La pression requise à cet effet peut être lue sur le manomètre ou déterminée à l'aide d'un instrument plus précis. Cette pression correspond à la pression de vapeur de la substance à la température de la mesure. L'appareil représenté sur la figure 3b permet une lecture directe de la pression de vapeur.

La pression de vapeur est déterminée à des intervalles de température rapprochés et judicieusement choisis (environ 5 à 10 points de mesure au total), jusqu'à la température maximale désirée.

Les mesures effectuées aux basses températures doivent être répétées à titre de vérification. Si les valeurs des mesures répétées ne coïncident pas avec la courbe obtenue en augmentant la température, cela peut traduire l'un des cas de figure suivants:

i) l'échantillon renferme encore de l'air (dans le cas de substances très visqueuses, par exemple) ou des substances à bas point d'ébullition qui sont libérées durant le chauffage;

ii) la substance subit une réaction chimique dans l'intervalle de température étudié (décomposition, polymérisation, par exemple).

1.5.3. **Méthode de l'isoténiscope**

1.5.3.1. *Principe*

L'isoténiscope (6) est fondé sur le principe de la méthode statique. Un échantillon est introduit dans une ampoule maintenue à température constante et reliée à un manomètre et à une pompe à vide. Les impuretés plus volatiles que la substance sont éliminées par dégazage à pression réduite. À des températures sélectionnées, la pression de vapeur de l'échantillon est équilibrée par la pression connue d'un gaz inerte. L'isoténiscope a été conçu pour mesurer la pression de vapeur de certains hydrocarbures liquides, mais il se prête aussi à l'étude des solides. En général, cette méthode ne convient pas pour des systèmes à plusieurs composants. Les résultats ne sont affectés que par de légères erreurs lorsque l'échantillon renferme des impuretés non volatiles. La gamme recommandée s'étend de 10^2 à 10^5 Pa.

1.5.3.2. *Appareillage*

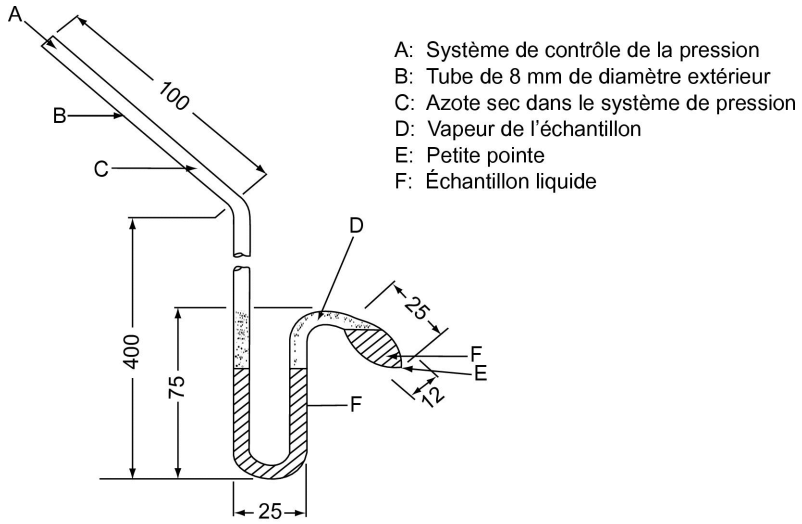
Un exemple de dispositif de mesure est donné à la figure 4. Pour la description complète, voir la norme ASTM D 2879-86 (6).

▼M1

1.5.3.3. *Mode opératoire*

Dans le cas des liquides, la substance elle-même sert de fluide de remplissage dans le manomètre différentiel. Une quantité de liquide, suffisante pour remplir l'ampoule et la branche courte du manomètre, est introduite dans l'isoténiscope. Ce dernier est relié au système de vide, mis sous vide puis rempli d'azote. L'évacuation et la purge du système sont répétées deux fois pour chasser l'oxygène résiduel. L'isoténiscope rempli est placé en position horizontale pour permettre à l'échantillon de s'étendre en fine couche dans l'ampoule destinée à le contenir et dans le manomètre. La pression du système est réduite à 133 Pa et l'échantillon est chauffé doucement jusqu'à ce qu'il entre en ébullition (élimination des gaz dissous). La position de l'isoténiscope est ensuite modifiée de façon que l'échantillon retourne dans l'ampoule et remplisse la branche courte du manomètre. La pression est maintenue à 133 Pa. La pointe de l'ampoule à échantillon est chauffée par une petite flamme jusqu'à ce que la vapeur dégagée par l'échantillon prenne une extension suffisante pour déplacer une partie de l'échantillon de la partie supérieure de l'ampoule et de la branche courte du manomètre vers le manomètre, créant ainsi un espace dépourvu d'azote et rempli de vapeur. L'isoténiscope est ensuite placé dans un bain thermostaté, et la pression de l'azote est ajustée de manière à égaler celle de l'échantillon. À l'équilibre, la pression de l'azote et la pression de vapeur de la substance ont la même valeur.

Figure 4



(dimensions en mm)

Dans le cas des solides, et suivant la gamme de pression et de température, des liquides manométriques tels que des huiles de silicone ou des phtalates sont utilisés. Le liquide manométrique dégazé est introduit dans un renflement situé sur la branche longue de l'isoténiscope. Un échantillon du solide est alors déposé dans l'ampoule et subit un dégazage à température élevée. Après cela, l'isoténiscope est incliné, afin que le liquide manométrique puisse couler dans le tube en U.

▼M1

1.5.4. **Méthode d'effusion: balance de pression de vapeur** (7)

1.5.4.1. *Principe*

Un échantillon de la substance d'essai est chauffé dans un petit fourneau, placé sous une cloche sous vide. Le fourneau est doté d'un couvercle percé de petits trous de diamètre connu. La vapeur de la substance, qui s'échappe par l'un des trous, est dirigée vers le plateau d'une balance très sensible qui se trouve également dans la cloche sous vide. Sur certains modèles d'appareil, le plateau de la balance est entouré par une enceinte de réfrigération, qui dissipe la chaleur vers l'extérieur par conduction thermique; la vapeur sortante se condense sur le plateau ainsi refroidi par radiation. L'impulsion du jet de vapeur exerce une force sur la balance. Il est possible de déterminer la pression de vapeur de deux manières: directement à partir de la force exercée sur le plateau de la balance ou à partir de la vitesse d'évaporation en utilisant l'équation de Herz-Knudsen (2):

$$p = G\sqrt{\frac{2\,\pi RT \times 10^3}{M}}$$

où:

G = vitesse d'évaporation (kg s^{-1} m^{-2})

M = masse molaire (g mol^{-1})

T = température (K)

R = constante molaire des gaz parfaits (J mol^{-1} K^{-1})

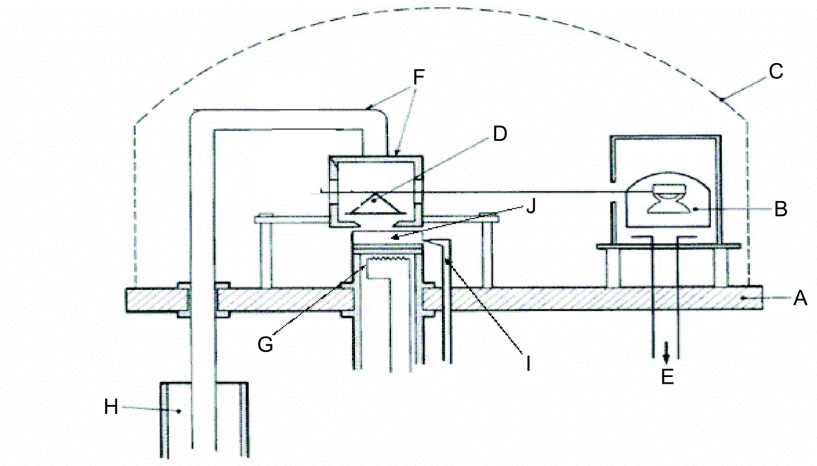
p = pression de vapeur (Pa)

La gamme de mesure recommandée est comprise entre 10^{-3} et 1 Pa.

1.5.4.2. *Appareillage*

Le principe général de l'appareil est illustré à la figure 5.

Figure 5



A.	Socle	F.	Enceinte de réfrigération et barre de refroidissement
B.	Instrument à bobine mobile	G.	Fourneau d'évaporation
C.	Cloche à vide	H.	Vase de Dewar contenant de l'azote liquide
D.	Balance avec plateau	I.	Mesure de la température de l'échantillon
E.	Instrument de mesure du vide	J.	Substance d'essai

▼**M1**

1.5.5. **Méthode d'effusion: cellule de Knudsen**

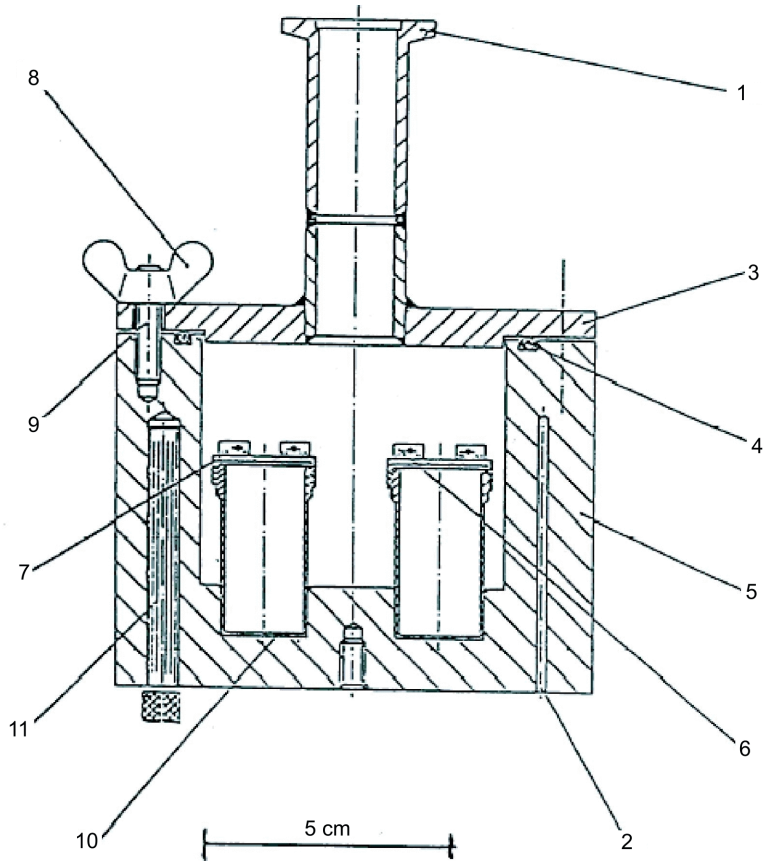
1.5.5.1. *Principe*

La méthode repose sur l'estimation de la masse de substance d'essai qui jaillit sous forme de vapeur par un micro-orifice d'une cellule de Knudsen (8) sous un vide très poussé, par unité de temps. La masse de vapeur dégagée par effusion s'obtient soit en déterminant la perte de masse de la cellule, soit en condensant la vapeur à basse température et en mesurant la quantité de substance volatilisée par chromatographie. La pression de vapeur se calcule par l'équation de Hertz-Knudsen (voir paragraphe 1.5.4.1) avec des facteurs de correction qui dépendent des paramètres de l'appareil (9). La gamme de pressions recommandée est comprise entre 10^{-10} et 1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2. *Appareillage*

Le principe général de l'appareil est illustré à la figure 6.

Figure 6



1: Vers la pompe à vide

2: Puits pour le thermomètre à résistance de platine ou le système de mesure et de régulation de la température

3: Couvercle de la chambre à vide

4: Joint torique

5: Chambre à vide en aluminium

6: Dispositif permettant d'installer et d'ôter les cellules à effusion

7: Couvercle fileté

8: Écrous papillon

9: Boulons

10: Cellules à effusion en acier inoxydable

11: Cartouches chauffantes

▼**M1**

1.5.6. **Méthode d'effusion: thermogravimétrie isotherme**

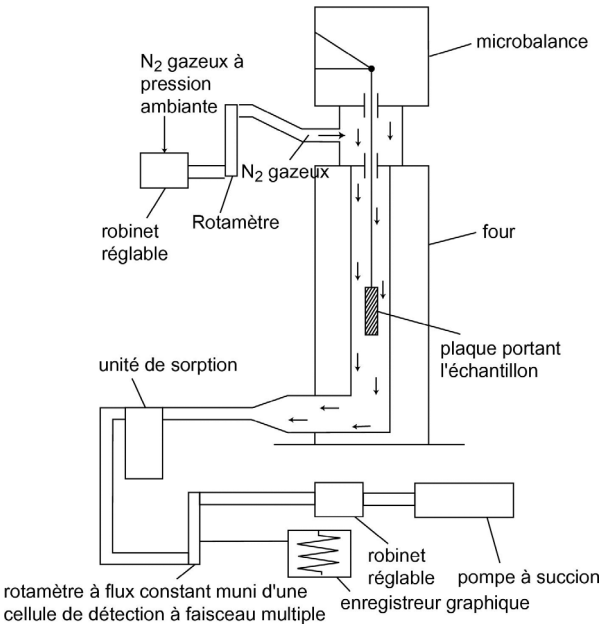
1.5.6.1. *Principe*

La méthode repose sur la détermination thermogravimétrique (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20), à hautes températures et à pression ambiante, de vitesses d'évaporation accélérée de la substance d'essai. Les vitesses d'évaporation v_T s'obtiennent en exposant la substance sélectionnée à l'atmosphère d'un gaz inerte s'écoulant lentement et en mesurant en continu la perte de poids à des températures isothermes T définies, exprimées en kelvins, durant des périodes de temps appropriées. Les pressions de vapeur p_T sont déduites des valeurs v_T à l'aide de la relation linéaire entre le logarithme de la pression de vapeur et le logarithme de la vitesse d'évaporation. Si nécessaire, les valeurs correspondant aux températures de 20 et 25 °C peuvent être extrapolées par la régression du log p_T en fonction de 1/T. Cette méthode convient aux substances ayant des pressions de vapeur aussi faibles que 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) et offrant un degré de pureté aussi proche que possible de 100 %, de manière à ne pas fausser l'interprétation des pertes de poids mesurées.

1.5.6.2. *Appareillage*

Le principe général du montage expérimental est schématisé à la figure 7.

Figure 7



La plaque portant l'échantillon, suspendue à une microbalance et placée dans une enceinte thermostatée, est exposée à un flux d'azote sec qui emporte les molécules vaporisées de la substance d'essai. Au sortir de l'enceinte, le flux gazeux est purifié dans une unité de sorption.

1.5.6.3. *Mode opératoire*

La substance d'essai est étalée en une couche homogène sur la surface d'une plaque de verre dépoli. S'il s'agit d'un solide, la plaque est mouillée uniformément par une solution de la substance dans un solvant approprié et séchée sous atmosphère inerte. Pour les mesures, la plaque enduite est suspendue dans l'analyseur thermogravimétrique et sa perte de poids est ensuite mesurée en continu en fonction du temps.

▼**M1**

La vitesse d'évaporation v_T à une température définie se calcule d'après la perte de poids Δm de la plaque portant l'échantillon selon la formule:

$$v_T = \frac{\Delta m}{F \cdot t} (g\ cm^{-2}h^{-1})$$

où F représente la superficie recouverte de substance d'essai, normalement la superficie de la plaque portant l'échantillon, et t est le temps écoulé durant la perte de poids Δm.

La pression de vapeur p_T est calculée en fonction de la vitesse d'évaporation v_T:

$$\text{Log } p_T = C + D \text{ log } v_T$$

où C et D sont des constantes propres au dispositif expérimental employé, qui dépendent du diamètre de l'enceinte de mesure et du débit du gaz. Ces constantes sont à déterminer une fois par la mesure d'une série de substances dont la pression de vapeur est connue et par la régression du log p_T en fonction de log v_T (11)(21)(22).

La relation entre la pression de vapeur p_T et la température T en kelvins est décrite ci-dessous:

$$\text{Log } p_T = A + B \cdot 1/T$$

où A et B représentent des constantes obtenues par la régression du log p_T en fonction de 1/T. Avec cette équation, la pression de vapeur peut être calculée par extrapolation pour n'importe quelle autre température.

1.5.7. **Méthode par saturation de gaz** (23)

1.5.7.1. *Principe*

Un gaz inerte est envoyé à température ambiante et à un débit connu, à travers ou sur un échantillon de la substance d'essai, suffisamment lentement pour qu'il devienne saturé de vapeur. Il est extrêmement important de parvenir à la saturation de la phase gazeuse. La substance transportée est recueillie, généralement à l'aide d'un adsorbant, et sa quantité est déterminée. Au lieu de recueillir la vapeur pour une analyse ultérieure, il est possible de mesurer directement la quantité de substance transportée par des techniques analytiques, telles que la chromatographie en phase gazeuse. La pression de vapeur est calculée en supposant que la loi des gaz parfaits est respectée et que la pression totale d'un mélange de gaz est égale à la somme des pressions des gaz qui le composent. La pression partielle de la substance d'essai, autrement dit sa pression de vapeur, est calculée à partir du volume total connu du gaz et du poids de la substance transportée.

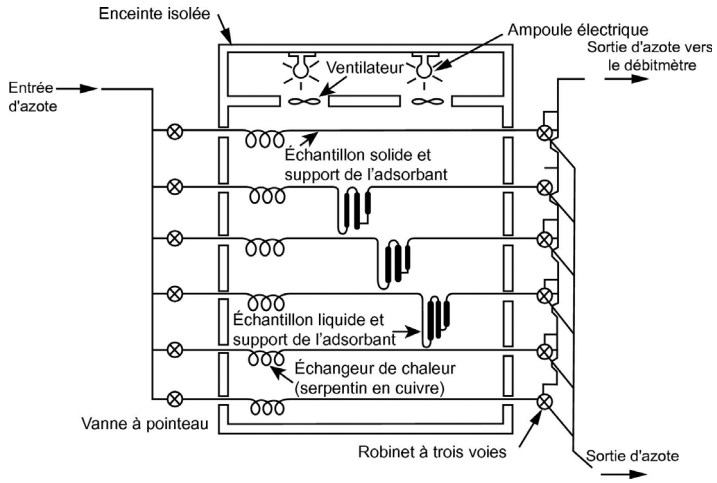
La méthode par saturation de gaz est applicable aux substances solides ou liquides. Cette méthode peut être utilisée jusqu'à des pressions de vapeur de 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14); elle est surtout fiable pour des pressions de vapeur inférieures à 10^3 Pa. Au-dessus de 10^3 Pa, les pressions de vapeur sont généralement surestimées, probablement à cause de la formation d'aérosols. Comme la pression de vapeur est mesurée à température ambiante, il n'est pas nécessaire d'extrapoler les résultats à partir de mesures réalisées à hautes températures et l'on évite de ce fait les erreurs grossières fréquemment associées à ce type d'extrapolation.

1.5.7.2. *Appareillage*

Cette méthode requiert une enceinte thermostatée. Le schéma de la figure 8 montre une enceinte comportant trois supports à échantillons solides et trois supports à échantillons liquides, qui permettent de réaliser, en trois exemplaires, l'analyse d'une substance solide ou liquide. La température est réglée avec une précision d'au moins 0,5 °C.

▼**M1**

Figure 8



L'azote convient dans la plupart des cas comme gaz porteur inerte, mais d'autres gaz doivent parfois être utilisés (24). Le gaz porteur doit être sec. Le courant gazeux est divisé en six courants, qui sont régulés par des vannes à pointeau (orifice d'environ 0,79 mm), et pénètre dans l'enceinte par des tubes en cuivre de 3,8 mm de diamètre intérieur. Une fois l'équilibre thermique atteint, le gaz passe à travers l'échantillon, puis sur l'adsorbant, et enfin sort de l'enceinte.

Les échantillons solides sont disposés dans des tubes en verre de 5 mm de diamètre intérieur, entre deux tampons de laine de verre (voir figure 9). La figure 10 montre un support à échantillon liquide et un système adsorbant. La méthode la plus reproductible pour mesurer la pression de vapeur des liquides consiste à remplir le support de perles de verre ou d'un adsorbant inerte tel que de la silice, que l'on recouvre de liquide. Une autre possibilité consiste à faire barboter le gaz porteur dans une colonne de la substance d'essai liquide à l'aide d'un verre fritté.

Figure 9

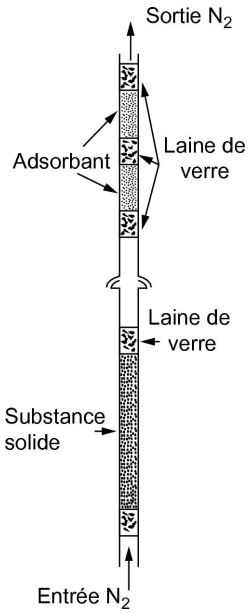
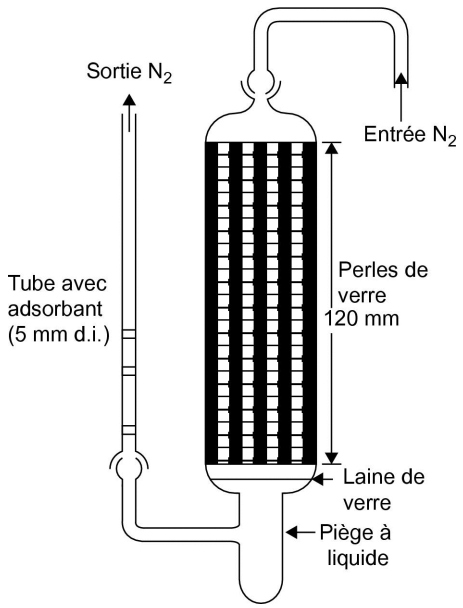


Figure 10



▼M1

Le système adsorbant se compose d'une section avant et d'une section arrière. À de très faibles pressions de vapeur, l'adsorbant ne retient que de petites quantités, et l'adsorption sur la laine de verre et sur le tube en verre, entre l'échantillon et l'adsorbant, peut représenter un sérieux problème.

Des pièges refroidis au CO_2 solide permettent aussi de recueillir efficacement la substance vaporisée. Ils n'affectent pas la perte de charge dans la colonne de saturation; de plus, il est facile d'isoler quantitativement la substance recueillie.

1.5.7.3. *Mode opératoire*

Le débit du gaz porteur sortant est mesuré à température ambiante. Pour s'assurer de la valeur exacte du volume total du gaz porteur, on vérifie fréquemment le débit au cours de l'expérience. Il est préférable de pratiquer un contrôle continu au moyen d'un débitmètre massique. La saturation de la phase gazeuse peut exiger un temps de contact considérable et, partant, des débits gazeux assez faibles (25).

À l'issue de l'expérience, les deux sections du système adsorbant, avant et arrière, sont analysées séparément. La substance retenue dans chaque section est désorbée par ajout d'un solvant. On analyse quantitativement les solutions ainsi obtenues afin de déterminer le poids de la substance désorbée dans chaque section. Le choix de la méthode analytique (ainsi que de l'adsorbant et du solvant désorbant) est dicté par la nature de la substance d'essai. On mesure l'efficacité de la désorption en fixant une quantité connue de la substance d'essai sur l'adsorbant, puis en la désorbant et en déterminant la quantité recueillie. Il importe de tester l'efficacité de la désorption en utilisant des concentrations proches de, ou égales à, celle de l'échantillon dans les conditions de l'essai.

Afin d'assurer la saturation du gaz porteur avec la substance d'essai, trois débits gazeux différents sont utilisés. Si la pression de vapeur calculée est indépendante du débit, on considère que le gaz est saturé.

La pression de vapeur est calculée d'après l'équation suivante:

$$p = \frac{W}{V} \times \frac{RT}{M}$$

où:

p = pression de vapeur (Pa)

W = masse de substance d'essai évaporée (g)

V = volume de gaz saturé (m^3)

R = constante molaire des gaz parfaits (8,314 J mol^{-1} K^{-1})

T = température (K)

M = masse molaire de la substance d'essai (g mol^{-1})

Les volumes mesurés doivent être corrigés pour tenir compte des différences de pression et de température entre le débitmètre et le saturateur.

▼M1

1.5.8. **Méthode de la jauge à rotor**

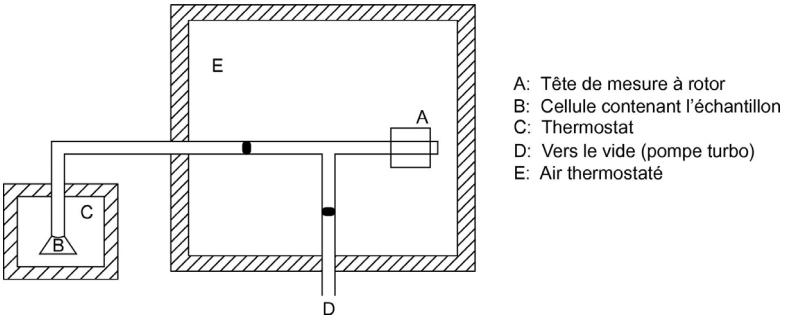
1.5.8.1. *Principe*

Cette méthode fait appel à une jauge de viscosité à rotor dans laquelle l'élément de mesure est une petite bille d'acier suspendue dans un champ magnétique et maintenue en rotation par des champs tournants (26)(27)(28). Des bobines capteuses permettent de mesurer sa vitesse de rotation. Lorsque la bille a atteint une vitesse de rotation donnée, généralement proche de 400 tours par seconde, on cesse de lui fournir de l'énergie et la friction du gaz provoque sa décélération. La diminution de la vitesse de rotation est mesurée en fonction du temps. La pression de vapeur est déduite du ralentissement de la bille d'acier, fonction de la pression. La gamme de mesure recommandée est comprise entre 10^{-4} et 0,5 Pa.

1.5.8.2. *Appareillage*

La figure 11 schématise le dispositif expérimental. La tête de mesure est placée dans une enceinte thermostatée à ± 0,1 °C près. La cellule contenant l'échantillon est placée dans une enceinte séparée, également thermostatée avec une précision de 0,1 °C. Toutes les autres parties du dispositif sont maintenues à une température plus élevée afin d'éviter la condensation. L'ensemble du système est relié à un système de vide poussé.

Figure 11



2. **RÉSULTATS ET RAPPORT**

2.1. RÉSULTATS

Quelle que soit la méthode choisie, la pression de vapeur doit être déterminée à au moins deux températures. Dans le domaine compris entre 0 et 50 °C, il est préférable d'effectuer des mesures à au moins trois températures, en vue de vérifier la linéarité de la courbe de pression de vapeur. Dans le cas de la méthode d'effusion (cellule de Knudsen et thermogravimétrie isotherme) et de la méthode par saturation de gaz, il est recommandé un intervalle de températures des mesures compris entre 120 et 150 °C, au lieu de 0 à 50 °C.

2.2. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit comprendre les informations suivantes:

— méthode utilisée,

▼**M1**

— caractéristiques précises de la substance (identité et impuretés) et étape préliminaire de purification, le cas échéant,

— pressions de vapeur mesurées à au moins deux températures, et de préférence à au moins trois températures, dans la gamme comprise entre 0 et 50 °C (ou 120 et 150 °C),

— dont au moins une est inférieure ou égale à 25 °C, pour autant que la méthode choisie le permette d'un point de vue technique,

— toutes les données brutes,

— courbe de log p en fonction de 1/T,

— estimation de la pression de vapeur à 20 °C ou à 25 °C.

Si une transition est observée (changement d'état, décomposition), il y a lieu de noter les informations suivantes:

— nature du changement,

— température à laquelle se produit le changement à pression atmosphérique,

— pression de vapeur à 10 et 20 °C en dessous de la température de la transition et à 10 et 20 °C au-dessus de cette température (sauf s'il s'agit une transition de l'état solide à l'état gazeux).

Toutes les informations et remarques utiles à l'interprétation des résultats doivent être rapportées, en particulier celles qui concernent les impuretés et l'état physique de la substance.

3. **BIBLIOGRAPHIE**

1) *Journal Officiel des Communautés européennes* L 383 A (1992) 26-47.

2) Ambrose, D. (1975). Experimental Thermodynamics, Vol. II, Le Neindre, B., and Vodar, B., Eds., Butterworths, London.

3) Weissberger R., ed. (1959). Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Vol. I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., New York.

4) Glasstone, S. (1946). Textbook of Physical Chemistry, 2nd ed., Van Nostrand Company, New York.

5) NF T 20-048 AFNOR (septembre 1985). Produits chimiques à usage industriel — détermination de la pression de vapeur des solides et des liquides dans le domaine 10^{-1} à 10^{5} Pa — méthode statique.

6) ASTM D 2879-86, Standard test method for vapour pressure — temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

7) NF T 20-047 AFNOR (septembre 1985). Produits chimiques à usage industriel — détermination de la pression de vapeur des solides et des liquides dans le domaine 10^{-3} à 1 Pa — méthode de la balance de pression de vapeur.

▼**M1**

8) Knudsen, M. (1909). Ann. Phys. Lpz., 29, 1979; (1911), 34, 593.

9) Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). J. Chem. Thermodynamics 7, 1173.

10) Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; Pest Management Science 56, 521-532.

11) Tomlin, C.D.S. (ed.), The Pesticide Manual, Twelfth Edition (2000)

12) Friedrich, K., Stammbach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. J. Chromatog. 16 (1964), 22-28

13) Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., Pesticide Science 16 (1982), 269-278.

14) Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, Thermochimia Acta 112 Issue 1 (1987), 117-122.

15) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; Pesticide Science 4 (1973) 137-147.

16) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; Pesticide Science 5 (1974) 393-400.

17) Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Part III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; Pesticide Science 13 (1982) 161-168.

18) Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; Pesticide Science 45 (1995) 27-31.

19) Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); Pesticide Science, 53 (1998) 300-310.

20) Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; Journal of Pharmaceutical Science 87(12) (1998) 1512-20.

21) Lide, D.R. (ed.), CRC Handbook of Chemistry and Physics, 81th ed.(2000), Vapour Pressure in the Range -25 °C to 150 °C.

22) Meister, R.T. (ed.), Farm Chemicals Handbook, Vol. 88 (2002)

23) 40 CFR, 796. (1993). pp 148-153, Office of the Federal Register, Washington DC

▼**M1**

24) Rordorf B.F. (1985). Thermochimica Acta 85, 435.

25) Westcott et al. (1981). Environ. Sci. Technol. 15, 1375.

26) Messer G., Röhl, P., Grosse G., and Jitschin W. (1987). J. Vac. Sci. Technol. (A), 5(4), 2440.

27) Comsa G., Fremerey J.K., and Lindenau, B. (1980). J. Vac. Sci. Technol. 17(2), 642.

28) Fremerey, J.K. (1985). J. Vac. Sci. Technol. (A), 3(3), 1715.

▼M1

Appendice

Méthode d'estimation

INTRODUCTION

Les valeurs estimées de la pression de vapeur peuvent être utilisées pour:

— choisir la méthode expérimentale appropriée,

— fournir une estimation ou une valeur limite lorsque la méthode expérimentale n'est pas applicable pour des raisons techniques.

MÉTHODE D'ESTIMATION

La pression de vapeur des liquides et des solides peut être estimée à l'aide de la corrélation modifiée de Watson (a). La seule donnée expérimentale requise est le point d'ébullition normal. Cette méthode est applicable entre 10^5 et 10^{-5} Pa.

Le «Handbook of Chemical Property Estimation Methods» (b) contient des informations détaillées sur cette méthode. Voir aussi «OECD Environmental Monograph No.67» (c).

PROCÉDURE DE CALCUL

La pression de vapeur se calcule de la façon suivante:

$$\ln P_{vp} \approx \frac{\Delta H_{vb}}{\Delta Z_b R T_b}\left[1 - \frac{\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^m}{\frac{T}{T_b}} - 2\,m\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_b}\right]$$

où:

T = température choisie

T_b = point d'ébullition normal

P_{vp} = pression de vapeur à la température T

ΔH_{vb} = la chaleur de vaporisation

ΔZ_b = coefficient de compressibilité (estimé à 0,97)

m = facteur empirique qui dépend de l'état physique à la température choisie

De plus,

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F\,(8{,}75 + R \ln T_b)$$

où K_F est un facteur empirique tenant compte de la polarité de la substance Les facteurs K_F de plusieurs types de substances sont énumérés dans la référence (b).

▼**M1**

Souvent, les données disponibles mentionnent un point d'ébullition à pression réduite. Dans ce cas, la pression de vapeur se calcule de la façon suivante:

$$\ln P_{vp} \approx \ln P_1 + \frac{\Delta H_{vl}}{\Delta Z_b R T_1}\left[1 - \left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^m \frac{T_1}{T} - 2\,m\left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_1}\right]$$

où T_1 représente le point d'ébullition à la pression réduite P_1.

RAPPORT

Si l'on utilise la méthode d'estimation, le calcul doit être accompagné d'une documentation détaillée.

BIBLIOGRAPHIE

a) Watson, K.M. (1943). Ind. Eng. Chem, 35, 398.

b) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.

c) OECD Environmental Monograph No.67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993).

▼B

A.5. **TENSION SUPERFICIELLE**

1. **MÉTHODE**

Les méthodes décrites se fondent sur les lignes directrices de l'OCDE (1). Leurs principes fondamentaux sont décrits dans la référence (2).

1.1. INTRODUCTION

Les méthodes décrites s'appliquent à la mesure de la tension superficielle des solutions aqueuses.

Avant d'effectuer ces essais, il sera bon d'avoir des informations préliminaires sur l'hydrosolubilité, la structure, les propriétés de la substance en matière d'hydrolyse et la concentration critique pour la formation de micelles.

Les méthodes suivantes s'appliquent à la plupart des substances chimiques, quel que soit leur degré de pureté.

La mesure de la tension superficielle par la méthode du tensiomètre à anneau est limitée aux solutions aqueuses ayant une viscosité dynamique inférieure à 200 mPa s environ.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

L'enthalpie libre de surface par unité de surface constitue la tension superficielle.

La tension surperficielle s'exprime en:

N/m (en unités SI) ou

mN/M (en sous-unités SI)

1 N/m = 10^3 dynes/cm

I mN/m = 1 dyne/cm dans le système cgs qui n'est plus utilisé.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉFENCE

Il n'est pas nécessaire d'employer des substances de référence dans tous les cas où l'on étudie une nouvelle substance. Elles doivent servir en premier lieu à vérifier de temps à autre la fiabilité de la méthode et à permettre de comparer les résultats obtenus avec différentes méthodes.

Des substances de référence couvrant une vaste gamme de tensions superficielles sont données dans les références (1) et (3).

1.4. PRINCIPE DES MÉTHODES

Les méthodes sont fondées sur la mesure de la force maximale qu'il faut exercer verticalement sur un étrier ou un anneau en contact avec la surface du liquide étudié, placé dans un récipient approprié, afin de le séparer de cette surface, ou sur une plaque, dont un des bords est en contact avec la surface, afin d'assurer l'arrachement du film formé.

Les substances hydrosolubles à une concentration supérieure à 1 mg/ml sont testées en solution aqueuse à une seule concentration.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

Ces méthodes fournissent une plus grande précision que ce qui est probablement requis pour le contrôle de la protection de l'environnement.

▼B

1.6. DESCRIPTION DES MÉTHODES

La substance est dissoute dans de l'eau distillée à une concentration correspondant à 90 % de la saturation de l'hydrosolubilité de cette substance; si cette concentration excède 1 g/l, l'essai est effectué avec une concentration de 1 g/l. Les substances dont l'hydrosolubilité est inférieure à 1 mg/l n'ont pas besoin d'être testées.

1.6.1. **Méthode de la plaque**

Voir ISO 304 et NF T 73-060 (substances tensioactives — détermination de la tension superficielle par arrachement de films liquides).

1.6.2. **Méthode de l'étrier**

Voir ISO 304 et NF T 73-060 (substances tensioactives — détermination de la tension superficielle par arrachement de films liquides).

1.6.3. **Méthode de l'anneau**

Voir ISO 304 et NF T 73-060 (substances tensioactives — détermination de la tension superficielle par arrachement de films liquides).

1.6.4. **Méthode de l'anneau harmonisée OCDE**

1.6.4.1. *Appareil*

Des tensiomètres commerciaux se prêtent à cette mesure. Ils comportent les éléments suivants:

— un porte-échantillon mobile,

— un dynamomètre,

— un corps de mesure (anneau),

— un récipient de mesure.

1.6.4.1.1. Porte-échantillon mobile

Le porte-échantillon mobile sert de support au récipient de mesure thermostaté, qui contient le liquide à étudier. Il est monté sur le même socle que le dynamomètre.

1.6.4.1.2. Dynamomètre

Le dynamomètre (voir figure) est placé au-dessus du porte-échantillon. L'erreur dans la mesure de la force ne doit pas dépasser ± 10^{-6} N, ce qui équivaut à une erreur limite de ± 0,1 mg dans une mesure de masse. Dans la plupart des cas, l'échelle de mesure des tensiomètres vendus dans le commerce est étalonnée en mN/m, si bien que l'on peut lire directement la tension superficielle en mN/m avec une précision de 0,1 mN/m.

▼B

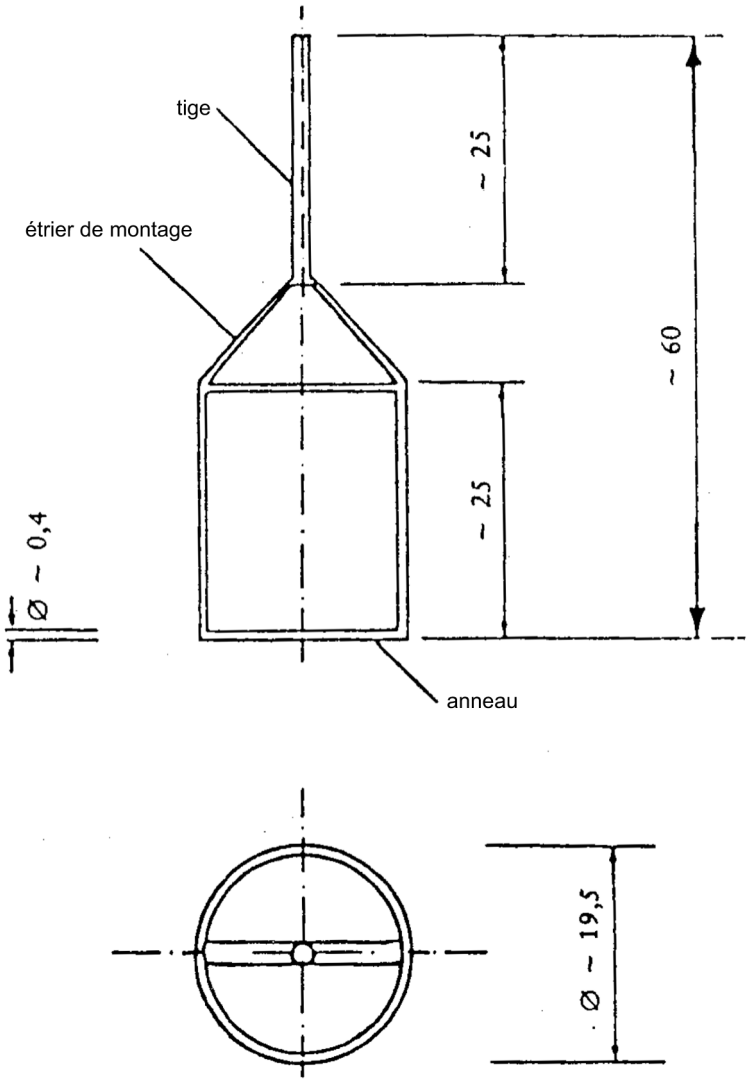
1.6.4.1.3. Corps de mesure (anneau)

L'anneau est habituellement constitué par un fil de platine ou de platine-iridium ayant une épaisseur de 0,4 millimètres environ et une circonférence moyenne de 60 millimètres. Cet anneau est suspendu horizontalement à l'étrier de montage qui est relié par une tige métallique au dynamomètre (voir figure).

Figure

Corps de mesure

(toutes les dimensions sont exprimées en millimètres)



1.6.4.1.4. Récipient de mesure

Le récipient de mesure qui contient la solution à tester doit être un récipient en verre thermostaté. Il doit être conçu de telle sorte que, au cours de la mesure, la température du liquide et de la phase gazeuse au-dessus de la surface reste constante et qu'il n'y ait pas d'évaporation. Des récipients cylindriques en verre d'un diamètre intérieur d'au moins 45 millimètres répondent à ces exigences.

▼B

1.6.4.2. *Préparation de l'appareil*

1.6.4.2.1. Nettoyage

La verrerie doit être nettoyée avec soin. Le cas échéant, elle sera lavée au mélange sulfochromique chaud, puis à l'acide phosphorique sirupeux (83 à 98 % en poids de H_3PO_4), rincée abondamment à l'eau courante et ensuite à l'eau bidistillée jusqu'au moment où l'on obtient une réaction neutre, et, enfin, séchée ou bien rincée avec une partie du liquide à mesurer.

L'anneau sera tout d'abord rincé abondamment à l'eau pour éliminer toutes les traces de substances hydrosolubles, plongé quelques secondes dans le mélange sulfochromique, rincé à l'eau bidistillée jusqu'à ce que l'on obtienne une réaction neutre, et, enfin, rapidement séché au-dessus d'une flamme de méthanol.

Note:

Les traces de substances qui ne sont pas dissoutes ou détruites par l'acide chromosulfurique ou l'acide phosphorique, telles que les silicones, doivent être éliminées à l'aide d'un solvant organique approprié.

1.6.4.2.2. Étalonnage de l'appareil

La validation de l'appareil consiste à vérifier le point zéro et à le régler de telle sorte que l'indication donnée par l'appareil permette une détermination fiable en mN/m.

Montage:

L'appareil sera mis à niveau, par exemple à l'aide d'un niveau à bulle placé sur le socle du tensiomètre, en ajustant des vis de réglage.

Réglage du point zéro:

Après montage de l'anneau sur l'appareil et avant son immersion dans le liquide, l'indicateur du tensiomètre doit être réglé à zéro; on vérifiera le parallélisme de l'anneau en utilisant la surface du liquide comme miroir.

Étalonnage:

L'étalonnage de l'appareil peut être effectué par l'une des deux méthodes suivantes:

a) à l'aide d'une masse: ce procédé utilise des cavaliers de masse connue (entre 0,1 et 1,0 g), qui sont placés successivement sur l'anneau. Le facteur d'étalonnage Φ_a, par lequel il y a lieu de multiplier toutes les lectures de l'instrument, sera déterminé au moyen de l'équation (1):

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a} \qquad (1)$$

où

$$\sigma_r = \frac{mg}{2b} \text{ (mN/m)}$$

m = masse du cavalier (g)

g = accélération de la pesanteur (981 cm s^{-2} au niveau de la mer)

b = circonférence moyenne de l'anneau (cm)

σ_a = lecture du tensiomètre après placement du cavalier sur l'anneau (mN/m);

▼B

b) à l'aide d'eau: ce procédé utilise de l'eau pure dont la tension superficielle, par exemple à 23 °C, est égale à 72,3 mN/m. Il est plus rapide que l'étalonnage à l'aide de cavaliers, mais il comporte toujours le risque que la tension superficielle de l'eau soit modifiée par des traces de substance tensioactive.

Le facteur d'étalonnage Φ_b, par lequel il faut multiplier toutes les lectures de l'appareil, sera déterminé à l'aide de l'équation ci-après (2):

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g} \qquad (2)$$

où:

σ_o = valeur donnée dans la littérature pour la tension superficielle de l'eau (mN/m)

σ_g = valeur mesurée de la tension superficielle de l'eau (mN/m) à cette même température.

1.6.4.3. *Préparation des échantillons*

Les solutions aqueuses de la substance à tester seront préparées compte tenu des concentrations requises. Il est impératif que la dissolution de la substance soit complète.

La solution ainsi préparée doit être maintenue à une température constante (± 0,5 °C). Étant donné que la tension superficielle d'une solution placée dans le récipient de mesure se modifie après un certain temps, il faut effectuer plusieurs mesures à des moments différents et tracer une courbe donnant la tension superficielle en fonction du temps. Lorsqu'il n'y a plus de modification, on a atteint un état d'équilibre.

La poussière ou les vapeurs d'autres substances faussent la mesure. Le travail doit donc s'effectuer sous une cloche de protection.

1.6.5. **Conditions de l'essai**

Les mesures doivent être effectuées à une température de 20 °C environ, sans variation supérieure à ± 0,5 °C.

1.6.6. **Déroulement de l'essai**

Les solutions à mesurer seront transférées dans le récipient de mesure soigneusement nettoyé, en prenant soin d'éviter la formation de mousse; ensuite, le récipient de mesure sera placé sur le porte-échantillon qui sera élevé jusqu'à ce que l'anneau soit immergé au-dessous de la surface de la solution. Le porte-échantillon est alors abaissé graduellement et uniformément (à une vitesse d'environ 0,5 cm/mn) pour retirer l'anneau de la surface du liquide et ce, jusqu'à ce que la force maximale soit atteinte. La couche du liquide accroché à l'anneau ne doit pas s'en détacher. Une fois les mesures achevées, l'anneau sera immergé à nouveau sous la surface, et les mesures répétées jusqu'à ce que l'on parvienne à une tension superficielle constante. À chaque détermination, le temps écoulé depuis le transfert de la solution dans le récipient de mesure sera enregistré. Des lectures seront effectuées à la valeur maximale de la force nécessaire pour retirer l'anneau de la surface du liquide.

▼B

2. **DONNÉES**

Pour calculer la tension superficielle, on multipliera tout d'abord la valeur lue sur l'appareil en mN/m par le facteur d'étalonnage Φ_a ou Φ_b (selon la méthode d'étalonnage utilisée). On obtiendra alors une valeur qui n'est qu'une approximation et doit ensuite être corrigée.

Harkins et Jordan (4) ont établi de manière empirique des facteurs de correction pour les valeurs de tension superficielle obtenues par la méthode de l'anneau, facteurs qui dépendent des dimensions de l'anneau, de la densité du liquide et de sa tension superficielle.

Étant donné le travail qu'exige la détermination du facteur de correction propre à chaque mesure à partir des tables de Harkins & Jordan, l'utilisation d'une méthode simplifiée de lecture directe de la tension superficielle corrigée à partir du tableau ci-après est autorisée pour les solutions aqueuses (on recourra à l'interpolation pour les lectures qui se situent entre deux valeurs du tableau.)

Tableau

Correction des valeurs mesurées de la tension superficielle

Valable seulement pour les solutions aqueuses, p≈1 g/cm^3

r	= 9,55 mm (rayon moyen de l'anneau)
r	= 0,185 mm (rayon du fil constituant l'anneau)

Valeur expérimentale (mN/nr)	Valeur corrigée (mN/m)	
	Étalonnage à l'aide de cavaliers (voir 1.6.4.2.2. (a)]	Étalonnage à l'aide d'eau [voir 1.6.4.2.2. (b)]
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	19,9	32,1
36	31,3	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9

▼B

Valeur expérimentale (mN/nr)	Valeur corrigée (mN/m)	
	Étalonnage à l'aide de cavaliers (voir 1.6.4.2.2. (a)]	Étalonnage à l'aide d'eau [voir 1.6.4.2.2. (b)]
58	53,2	57
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Ce tableau a été établi sur la base de la correction de Harkins-Jordan et correspond à celle de la norme DIN (DIN 53914) concernant l'eau et les solutions aqueuses (densité $\rho = 1\ g/cm^3$), et pour un anneau vendu dans le commerce dont les dimensions sont R = 9,55 mm (rayon moyen de l'anneau) et r = 0,185 mm (rayon du fil constituant l'anneau). Le tableau donne les valeurs corrigées des mesures de tension superficielle effectuées après un étalonnage au moyen de cavaliers ou d'eau pure.

Une autre solution consiste à calculer la tension superficielle, sans étalonnage préalable, selon la formule suivante:

$$\sigma = \frac{f \times F}{4\pi R}$$

où

F = la force mesurée sur le dynamomètre au point de rupture du film

R = le rayon de l'anneau

f = le facteur de correction (1)

3. **RÉSULTATS**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

— méthode utilisée,

— le type d'eau ou de solution utilisé,

— les spécifications précises de la substance étudiée (identité et impuretés),

— le résultat des mesures: tension superficielle (lue) en indiquant à la fois les différentes lectures et leur moyenne arithmétique, ainsi que la valeur moyenne corrigée (compte-tenu du facteur dû au matériel et du tableau de correction),

▼B

— la concentration de la solution,

— la température de l'essai,

— l'âge de la solution utilisée, en particulier le temps écoulé entre la préparation de la solution et sa mesure,

— l'évolution de la tension superficielle en fonction du temps à partir du moment où la solution a été transférée dans le récipient de mesure,

— toutes les informations et observations pertinentes pour l'interprétation des résultats doivent être signalées, notamment les impuretés et l'état physique de la substance.

3.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Étant donné que la tension superficielle de l'eau est de 72,75 mN/m à 20 °C, les substances dont la tension superficielle est inférieure à 60 mN/m, dans les conditions propres à cette méthode, doivent être considérées comme des produits tensioactifs.

4. **RÉFÉFENCES**

(1) OCDE, Paris, 1981, Ligne directrice 115, décision du Conseil C(81) 30 Final.

(2) R. Weissberger ed., Technique of organic chemistry, Chapter XIV, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed, Interscience Publ. New York, 1959, Vol. I, Part I.

(3) Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, 511.

(4) Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc, 1930, vol. 52, 1751.

▼M4

A.6. **SOLUBILITÉ DANS L'EAU**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 105 (1995) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Cette méthode d'essai constitue une révision de la ligne directrice 105 adoptée en 1981. S'il n'y a pas eu de modification de fond, la présentation a été remaniée. La révision s'appuie sur la méthode d'essai «Hydrosolubilité» de l'Union européenne ([1]).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

2. La présence d'impuretés peut considérablement modifier la solubilité d'une substance dans l'eau. La présente méthode d'essai porte sur la mesure de la solubilité de substances essentiellement pures, stables dans l'eau et non volatiles. Avant de déterminer la solubilité dans l'eau, il est utile de disposer d'informations sur la substance telles que la formule développée, la pression de vapeur, la constante de dissociation et l'hydrolyse en fonction du pH.

3. Les deux méthodes décrites dans cette méthode d'essai, la méthode par élution sur colonne et la méthode du flacon, couvrent respectivement les solubilités inférieures et supérieures à 10^{-2} g/l. Un essai préliminaire simple est également décrit. Il permet de déterminer approximativement la quantité de substance à utiliser dans l'essai proprement dit, ainsi que le temps nécessaire pour atteindre la saturation.

DÉFINITIONS ET UNITÉS

4. La solubilité d'une substance dans l'eau est la concentration massique de saturation de cette substance dans l'eau à une température donnée.

5. La solubilité dans l'eau est exprimée en masse de soluté par volume de solution. L'unité SI est le kg/m^3, mais on utilise également le g/l.

SUBSTANCES CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE

6. Il n'y a pas lieu d'employer des substances de référence lorsqu'on étudie une substance.

DESCRIPTION DES MÉTHODES

Conditions de l'essai

7. L'essai est pratiqué de préférence à 20 °C ± 0,5 °C. La température choisie sera maintenue constante dans toutes les parties du dispositif expérimental où elle peut avoir une influence.

Essai préliminaire

8. Des volumes d'eau croissants sont ajoutés progressivement à environ 0,1 g d'échantillon (les solides doivent être pulvérisés), à température ambiante, dans un flacon gradué de 10 ml fermé par un bouchon en verre. Après chaque ajout d'eau, le mélange est agité pendant 10 minutes. On vérifie ensuite visuellement si l'échantillon est complètement dissous. Si des parties non dissoutes de l'échantillon subsistent après l'addition de 10 ml d'eau, l'essai se poursuit dans un flacon gradué de 100 ml. La solubilité

▼M4

approximative est indiquée dans le tableau 1, au-dessous du volume d'eau qui dissout complètement l'échantillon. Si la solubilité est faible, le temps requis pour dissoudre la substance peut être long et il faut attendre au moins 24 heures. Si après 24 heures la substance n'est toujours pas dissoute, il y a lieu d'attendre jusqu'à 96 heures ou de procéder à une dilution plus poussée, afin de déterminer s'il convient d'utiliser la méthode par élution sur colonne ou la méthode du flacon.

Tableau 1

ml d'eau dissolvant 0,1 g	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
solubilité approximative en g/l	> 1 000	1 000 à 200	200 à 100	100 à 50	50 à 10	10 à 1	< 1

Méthode par élution sur colonne

Principe

9. Il s'agit d'éluer la substance à étudier avec de l'eau d'une microcolonne remplie d'un support inerte et préalablement revêtu d'un excès de la substance à étudier (2). La solubilité correspond au plateau de la courbe de la concentration massique de l'éluat en fonction du temps.

Appareillage

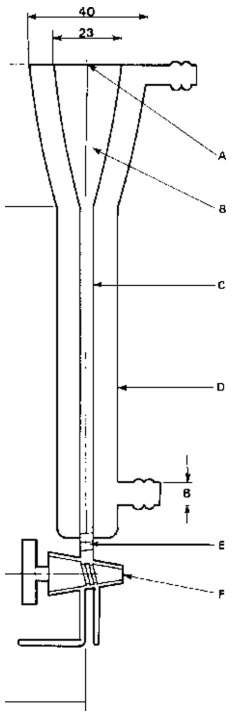
10. L'appareil se compose d'une microcolonne (figure 1) thermostatée, reliée soit à une pompe de recirculation (figure 2), soit à un réservoir de remise à niveau (figure 3). La microcolonne contient un support inerte maintenu en place par un petit tampon de laine de verre, qui sert aussi à filtrer les particules. Divers matériaux peuvent être employés comme support: billes de verre, terre de diatomées ou autres matériaux inertes.

11. La microcolonne représentée à la figure 1 convient au montage comportant une pompe de recirculation. Elle a un volume tampon correspondant à cinq fois le volume de son lit (les premiers cinq volumes de lit sont rejetés au début de l'expérience) et au volume de cinq échantillons (prélevés pour analyse pendant l'expérience). On peut cependant réduire le volume tampon à condition de pouvoir ajouter de l'eau au système pendant l'expérience pour remplacer les premiers cinq volumes de lit éliminés avec les impuretés. La colonne est reliée, par un tuyau en matériau inerte, à une pompe de recirculation capable de pomper environ 25 ml/h. La pompe de recirculation peut être, par exemple, une pompe péristaltique ou une pompe à membrane. Il faut veiller à ce que le matériau du tuyau n'occasionne aucune contamination et/ou adsorption.

12. Un montage comportant un réservoir de remise à niveau est schématisé à la figure 3. Dans ce montage, la microcolonne est munie d'un robinet d'arrêt à une voie. Elle est reliée au réservoir de remise à niveau par un tube en matériau inerte et un raccord en verre rodé. Le débit du réservoir de remise à niveau doit avoisiner 25 ml/h.

▼**M4**

Figure 1



Dimensions en mm

A. Raccordement pour joint en verre rodé

B. Volume tampon

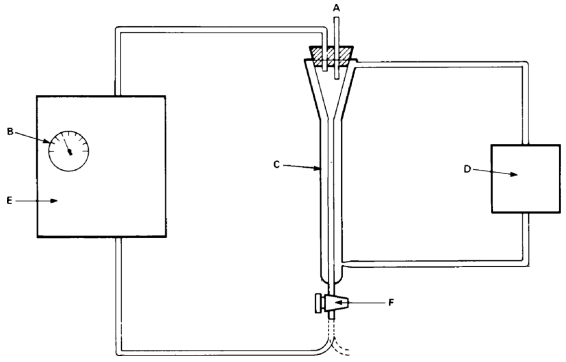
C. Diamètre intérieur 5

D. Diamètre extérieur 19

E. Tampon en laine de verre

F. Robinet d'arrêt

Figure 2



A. Équilibrage atmosphérique

B. Débitmètre

C. Microcolonne

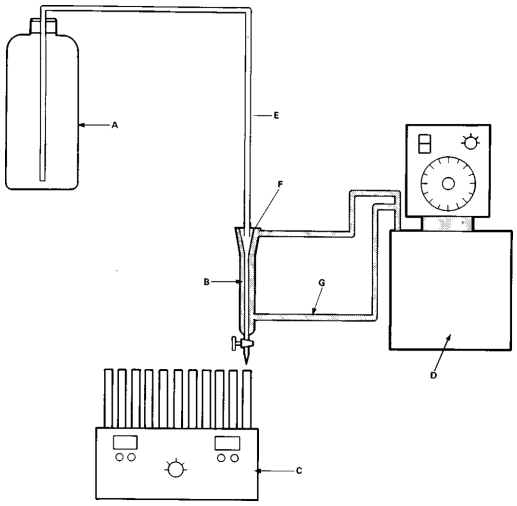
D. Pompe de circulation thermostatée

E. Pompe de recirculation

F. Robinet à deux voies pour l'échantillonnage

▼**M4**

Figure 3



A. Réservoir de remise à niveau (par exemple, un flacon de laboratoire de 2,5 litres)

B. Colonne

C. Collecteur de fractions

D. Thermostat

E. Tuyau en téflon

F. Joint en verre rodé

G. Conduite d'eau (entre le thermostat et la colonne, diamètre intérieur d'environ 8 millimètres)

13. Verser environ 600 mg de matériau de support dans un flacon à fond rond de 50 ml. Dissoudre une quantité appropriée de substance à étudier dans un solvant volatil de qualité pour analyse et ajouter une quantité déterminée de cette solution au matériau support. Le solvant doit être complètement évaporé, par exemple à l'aide d'un évaporateur rotatif, sinon l'eau ne pourra pas saturer le support pendant l'élution à cause d'un effet de répartition à la surface. Faire tremper le support chargé pendant deux heures dans environ 5 ml d'eau et verser la suspension dans la microcolonne, ou bien verser le support sec dans la microcolonne déjà remplie d'eau et le laisser s'équilibrer pendant deux heures.

14. Le chargement du support peut causer des problèmes conduisant à des résultats erronés, par exemple lorsque la substance à étudier est déposée sous forme d'huile. Ces problèmes doivent être examinés et détaillés dans le rapport.

Méthode avec une pompe de recirculation

15. La circulation dans la colonne est amorcée. Il est recommandé d'appliquer un débit d'environ 25 ml/h, soit dix volumes de lit par heure pour la colonne décrite. Les premiers cinq volumes de lit au moins sont rejetés pour éliminer les impuretés hydrosolubles. Après quoi, on laisse fonctionner la pompe jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint. L'équilibre est attesté lorsque l'analyse de cinq échantillons successifs donne des concentrations qui ne diffèrent pas de plus de ± 30 % de façon aléatoire. Ces prélèvements doivent être séparés entre eux par des intervalles de temps correspondant au passage d'au moins dix volumes de lit. Avec certaines méthodes analytiques, il peut être préférable de démontrer que l'équilibre est atteint à l'aide d'une courbe de la concentration en fonction du temps.

▼M4

Méthode avec réservoir de remise à niveau

16. Des fractions successives d'éluat sont recueillies et analysées suivant la méthode choisie. Les fractions du milieu de l'intervalle d'élution, là où la concentration demeure constante à ± 30 % près dans au moins cinq prélèvements consécutifs, servent à déterminer la solubilité.

17. L'eau bidistillée est le meilleur éluant. On peut aussi utiliser de l'eau désionisée, caractérisée par une résistivité supérieure à 10 mégaohms/cm et une teneur totale en carbone organique inférieure à 0,01 %.

18. Pour chaque méthode, l'opération est répétée en réduisant le débit de moitié. Si les résultats des deux opérations concordent, l'essai est satisfaisant. Si l'on mesure une solubilité plus élevée avec le débit inférieur, il y a lieu de continuer à diminuer le débit de moitié jusqu'à ce que deux essais successifs donnent la même solubilité.

19. Pour chaque méthode, il faut vérifier la présence de matières colloïdales dans les fractions, par détection de l'effet Tyndall. La présence de particules fausse les résultats et l'essai doit être répété après avoir amélioré le pouvoir de filtration de la colonne.

20. Le pH de chaque échantillon doit être mesuré, de préférence au moyen de bandelettes indicatrices spéciales.

Méthode du flacon

Principe

21. La substance est dissoute dans l'eau (les solides doivent être pulvérisés) à une température légèrement supérieure à celle de l'essai. Une fois la saturation obtenue, le mélange est refroidi et maintenu à la température de l'essai. Il est toutefois possible de réaliser la mesure directement, à la température de l'essai, si un échantillonnage pertinent prouve que l'équilibre de saturation a été atteint. Ensuite, la concentration de la substance est déterminée par une méthode analytique appropriée (3). La solution analysée ne doit contenir aucune particule non dissoute.

Appareillage

22. Le matériel suivant est requis:

— verrerie et instruments courants de laboratoire,

— dispositif pour agiter les solutions à température constante,

— si nécessaire, une centrifugeuse (thermostatée de préférence) pour les émulsions,

— équipement d'analyse.

Mode opératoire

23. Évaluer la quantité de substance nécessaire pour saturer le volume d'eau voulu, à la lumière de l'essai préliminaire. Introduire l'équivalent d'environ cinq fois cette quantité dans chacun des trois récipients en verre munis d'un bouchon en verre (tubes à centrifuger, flacons, par exemple). Ajouter un volume d'eau, choisi en fonction de la méthode analytique et de la gamme de solubilité, dans chaque récipient. Les récipients sont bouchés hermétiquement et ensuite agités à 30 °C. Il convient d'utiliser un système d'agitation ou mélangeur capable de fonctionner à température constante, par exemple un agitateur magnétique combiné à un bain-marie thermostaté. Après un jour, laisser l'un des récipients s'équilibrer pendant 24 heures à la température de l'essai en l'agitant de temps en temps. Centrifuger ensuite le contenu du récipient à la température de l'essai et déterminer, par une méthode analytique idoine, la concentration de la substance dans la phase aqueuse limpide. Les deux autres flacons sont traités de la même manière

▼M4

après avoir été équilibrés à 30 °C pendant deux et trois jours respectivement. Si les concentrations mesurées au moins dans les deux derniers flacons ne diffèrent pas de plus de 15 %, l'essai est satisfaisant. Si les résultats obtenus avec les flacons 1, 2 et 3 tendent à croître, il est nécessaire de refaire tout l'essai en appliquant des temps d'équilibrage plus longs.

24. L'essai peut aussi être conduit sans préincubation à 30 °C. Afin d'estimer la rapidité avec laquelle s'établit l'équilibre de saturation, des échantillons sont prélevés jusqu'à ce que la durée de l'agitation n'influence plus les concentrations mesurées.

25. Le pH de chaque échantillon doit être mesuré, de préférence au moyen de bandelettes indicatrices spéciales.

Déterminations analytiques

26. Il est préférable d'employer une méthode d'analyse spécifique pour la substance, de petites quantités d'impuretés solubles pouvant fausser gravement la mesure de la solubilité. Parmi les méthodes possibles, citons la chromatographie en phase gazeuse ou liquide, le titrage, la photométrie, la voltamétrie.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

Méthode par élution sur colonne

27. Pour chaque essai, il faut calculer la moyenne et l'écart-type sur au moins cinq échantillons consécutifs issus du plateau de saturation. Les moyennes établies à partir de deux essais pratiqués à des débits différents ne doivent pas s'écarter de plus de 30 %.

Méthode du flacon

28. On calcule la moyenne des résultats obtenus avec chacun des trois flacons. Ces résultats ne doivent pas différer de plus de 15 %.

Rapport d'essai

Méthode par élution sur colonne

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

— résultats de l'essai préliminaire,

— identité chimique de la substance et impuretés (étape de purification préliminaire, le cas échéant),

— concentration, débit et pH pour chaque échantillon,

— moyennes et écarts-type sur au moins cinq échantillons provenant du plateau de saturation pour chaque essai,

— moyenne d'au moins deux essais successifs,

— température de l'eau au cours du processus de saturation,

— méthode d'analyse,

— nature du matériau du support,

— chargement du support,

— solvant utilisé,

— toute manifestation d'instabilité chimique de la substance pendant l'essai,

— toute information utile à l'interprétation des résultats, notamment en ce qui concerne les impuretés et l'état physique de la substance.

▼**M4**

Méthode du flacon

30. Le rapport d'essai doit comprendre les informations suivantes:

— résultats de l'essai préliminaire,

— identité chimique de la substance et impuretés (étape de purification préliminaire, le cas échéant),

— résultats d'analyse individuels et moyenne si plus d'une valeur a été déterminée pour un même flacon,

— pH de chaque échantillon,

— moyenne des valeurs de différents flacons lorsque celles-ci concordent,

— température de l'essai,

— méthode d'analyse,

— toute manifestation d'instabilité chimique de la substance pendant l'essai,

— toute information utile à l'interprétation des résultats, notamment en ce qui concerne les impuretés et l'état physique de la substance.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) Directive 92/69/CEE de la Commission du 31 juillet 1992 portant dix-septième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses (JO L 383 du 29.12.1992, p. 113).

(2) NF T 20-045 (AFNOR) (septembre 1985). Produits chimiques à usage industriel — Détermination de la solubilité dans l'eau des solides et liquides à faible solubilité — Méthode de l'élution sur colonne

(3) NF T 20-046 (AFNOR) (septembre 1985). Produits chimiques à usage industriel — Détermination de la solubilité dans l'eau des solides et liquides à forte solubilité — Méthode du flacon.

▼B

A.8. COEFFICIENT DE PARTAGE

1. MÉTHODE

La méthode par «agitation en flacon» décrite est basée sur les lignes directrices de l'OCDE (1).

1.1. INTRODUCTION

Il est utile de disposer d'informations préliminaires sur la formule développée, la constante de dissociation, l'hydrosolubilité, l'hydrolyse, la solubilité dans le n-Octanol et la tension superficielle de la substance pour exécuter cet essai.

Les mesures concernant les substances ionisables ne doivent être réalisées qu'avec leur forme non ionisée (acide libre ou base libre) obtenue à l'aide d'un tampon approprié dont le pH est inférieur (acide libre) ou supérieur (base libre) au pK, au moins d'une unité pH.

La présente méthode d'essai comporte deux techniques distinctes: la méthode par agitation en flacon et la chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC). La première est applicable lorsque la valeur de log P_{ow} (voir définition ci-après) tombe dans l'intervalle compris entre 2 et 4, et la seconde dans l'intervalle compris entre 0 et 6. Avant d'effectuer l'une de ces techniques expérimentales, il y a lieu de procéder à une estimation préliminaire du coefficient de partage.

La méthode par agitation en flacon ne s'applique qu'aux substances essentiellement pures, solubles dans l'eau et dans le n-Octanol. Elle n'est pas applicable aux substances tensioactives (pour lesquelles il convient de fournir une valeur calculée ou une estimation fondée sur les solubilités individuelles dans l'eau et le n-Octanol).

La méthode de HPLC ne s'applique pas aux acides et aux bases forts, aux complexes métalliques, aux substances tensioactives et aux substances qui réagissent avec l'éluant. Pour ces produits, il convient de fournir une valeur calculée ou une estimation fondée sur les solubilités individuelles dans l'eau et le n-Octanol.

La méthode de HPLC est moins sensible à la présence d'impuretés dans le composé à tester que la méthode par agitation en flacon. Les impuretés peuvent toutefois, dans certains cas, compliquer l'interprétation des résultats en rendant incertaine l'identification des pics. Pour des mélanges qui donnent des pics non résolus, il faut noter la limite inférieure et la limite supérieure de log P.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Le coefficient de partage (P) est défini comme étant le rapport des concentrations à l'équilibre (c_i) d'une substance dissoute dans un système biphasique consistant en deux solvants quasiment non miscibles. Dans le cas du n-Octanol et de l'eau:

$$p_{ow} = \frac{C_{n-octanol}}{C_{eau}}$$

Le coefficient de partage (P) est donc le quotient de deux concentrations; il est généralement indiqué sous la forme de son logarithme, base 10 (log P).

▼B

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Méthode par agitation en flacon

Il n'est pas nécessaire d'employer des substances de référence dans tous les cas où l'on étudie une nouvelle substance. Elles doivent servir en premier lieu à vérifier de temps à autre la fiabilité de la méthode et à permettre de comparer les résultats obtenus avec différentes méthodes.

Méthode de HPLC

Pour établir une corrélation entre les données mesurées par HPLC et le coefficient de partage d'un composé, il faut établir une courbe d'étalonnage de log P par rapport aux données chromatographiques, à l'aide de six points de référence au moins. Le choix des substances de référence appropriées est laissé à l'utilisateur. Au moins un des composés de référence doit, si possible, avoir un P_{ow} supérieur, et un autre un P_{ow} inférieur à celui de la substance à étudier. Pour des valeurs de log P inférieures à 4, l'étalonnage peut reposer sur les données obtenues avec la méthode par agitation en flacon. Pour des valeurs de log P supérieures à 4, l'étalonnage peut être effectué à partir de valeurs validées citées dans la littérature, si celles-ci concordent avec des valeurs calculées. 11 est préférable, pour une plus grande précision, de choisir des composés de référence dont la structure est apparentée à celle de la substance à étudier.

Des listes de valeurs de log P ont été établies pour un grand nombre de produits chimiques (2) (3). Si l'on ne dispose pas de données relatives au coefficient de partage de composés de structures voisines, il faut utiliser un étalonnage plus général, établi avec d'autres composés de référence.

L'annexe II présente une liste de substances de référence recommandées et la valeur de leur P_{ow}.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

1.4.1. **Méthode par agitation en flacon**

Pour déterminer un coefficient de partage, il faut parvenir à un équilibre entre l'ensemble des éléments constitutifs du système s'influençant mutuellement et déterminer les concentrations des substances dissoutes dans les deux phases. Une étude bibliographique sur ce sujet fait apparaître que plusieurs techniques différentes permettent de résoudre ce problème, à savoir le mélange complet de deux phases suivi de leur séparation dans le but de déterminer la concentration à l'équilibre de la substance étudiée.

1.4.2. **Méthode de HPLC**

La HPLC est effectuée sur des colonnes analytiques remplies d'une phase solide contenant de longues chaînes d'hydrocarbures (par exemple C8, C18) liées chimiquement à de la silice, vendue dans le commerce. Les produits chimiques déposés sur une telle colonne se déplacent sur toute sa longueur à des vitesses différentes en raison de leur différence de taux de partage entre la phase mobile et la phase fixe hydrocarbonée. Les mélanges de produits chimiques sont élués par ordre d'hydrophobicité: les produits hydrosolubles sont élués les premiers et les produits liposolubles, les derniers, proportionnellement à leur coefficient de partage entre l'eau et les hydrocarbures. Ainsi peut on établir une relation entre le temps de rétention sur une telle colonne (à phase inversée) et le coefficient de partage n-Octanol/eau. Le coefficient de partage est déduit du *facteur de capacité k*, défini par l'expression suivante:

▼B

$$k = \frac{t_R - t_o}{t_o}$$

où t_R = temps de rétention de la substance à étudier et t_0 = temps moyen nécessaire à une molécule de solvant pour traverser la colonne (temps mort).

Il n'est pas nécessaire de disposer d'une méthode analytique quantitative; il suffit de déterminer les temps d'élution.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

1.5.1. **Répétabilité**

Méthode par agitation en flacon

Pour garantir la précision du coefficient de partage, on doit procéder à des déterminations en double, dans trois conditions d'essai différentes, la quantité de substance spécifiée ainsi que le rapport des volumes de solvant pouvant être modifiés. Les valeurs déterminées de ce coefficient, exprimées sous la forme de leurs logarithmes communs, doivent se situer dans un intervalle de ± 0,3 unité log.

Méthode de HPLC

Afin d'augmenter la fiabilité des mesures, on procédera à des déterminations en double. Les valeurs de log P issues de mesures individuelles doivent se situer dans un intervalle de ± 0,1 unité log.

1.5.2. **Sensibilité**

Méthode par agitation en flacon

L'intervalle de mesure de la méthode est déterminé par la limite de détection du procédé analytique. Celle-ci doit permettre de déterminer les valeurs de log P_{ow} dans l'intervalle de - 2 à 4 (cet intervalle peut occasionnellement, lorsque les conditions le permettent, être étendu à des valeurs de log P_{ow} allant jusqu'à 5) lorsque la concentration du soluté n'excède pas 0,01 mol par litre dans l'une ou l'autre phase.

Méthode de HPLC

La méthode de HPLC permet d'estimer des coefficients de partage dans une gamme de valeurs de log P_{ow} comprises entre 0 et 6.

Normalement, le coefficient de partage d'un composé peut être estimé avec une précision de ± 1 unité log de la valeur obtenue avec la méthode par agitation en flacon. On peut trouver des exemples de corrélations dans la littérature (4) (5) (6) (7) (8). Une plus grande précision peut généralement être obtenue lorsque la courbe de corrélation est établie avec des composés de référence de structure voisine (9).

▼B

1.5.3. **Spécificité**

Méthode par agitation en flacon

La loi de partage de Nernst ne s'applique qu'à température, pression et pH constants pour les solutions diluées. Rigoureusement, elle ne s'applique qu'à une substance dispersée entre deux solvants purs. Les résultats peuvent être affectés par l'apparition simultanée, dans l'une ou dans les deux phases, de plusieurs solutés différents.

La dissociation ou l'association de molécules dissoutes se traduit par des déviations par rapport à la loi de partage citée. Ces déviations s'expliquent par le fait que le coefficient de partage dépend dès lors de la concentration de la solution.

En raison des équilibres multiples en présence, cette méthode d'essai ne doit pas être appliquée sans correction aux composés ionisables. Dans ce cas, il faut envisager de remplacer l'eau par des solutions tampons dont le pH doit être distant d'au moins une unité pH du pKa de la substance; il faut tenir compte de l'importance de ce pH pour l'environnement.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Estimation préliminaire du coefficient de partage**

La valeur du coefficient de partage est estimée de préférence à l'aide d'une méthode de calcul (voir annexe 1), ou bien, s'il y a lieu, à partir du rapport des valeurs de solubilité de la substance à étudier dans des solvants purs (10).

1.6.2. **Méthode par agitation en flacon**

1.6.2.1. *Préparation*

n-Octanol: la détermination du coefficient de partage doit être effectuée en recourant à un réactif de qualité analytique.

Eau: utiliser de l'eau distillée ou bidistillée dans un appareil de verre ou de quartz. Pour les composés ionisables, remplacer, si c'est justifié, l'eau par des solutions tampons.

Note:

Ne pas utiliser l'eau provenant directement d'un échangeur d'ions.

1.6.2.1.1. Présaturation des solvants

Avant de déterminer un coefficient de partage, les phases du système de solvants sont saturées réciproquement par agitation à température d'essai. Pour ce faire, il est pratique d'agiter pendant vingt-quatre heures, dans un agitateur mécanique, deux grands flacons contenant du n-Octanol pur de qualité analytique ou de l'eau, avec une quantité suffisante de l'autre solvant, puis de les laisser reposer jusqu'à ce que les phases se séparent et que l'on parvienne à un état de saturation.

▼B

1.6.2.1.2. Préparation de l'essai

Le volume liquide doit remplir presque complètement le récipient d'essai afin d'éviter toute perte de matière due à la volatilisation. Le rapport de volume et les quantités de substance à utiliser sont fixés comme suit:

— estimation préliminaire du coefficient de partage (voir ci-avant),

— quantité minimale de substance à tester requise par le procédé analytique utilisé,

— limite de concentration maximale dans chaque phase de 0,01 mol par litre.

Trois essais sont effectués. Pour le premier, on utilise le rapport n-Octanol/eau calculé, pour le second, ce rapport est réduit de moitié et pour le troisième, il est doublé (par exemple 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Substance à étudier

Une solution de réserve est préparée dans du n-Octanol présaturé d'eau. La concentration de cette solution mère doit être déterminée avec précision avant de l'utiliser pour déterminer le coefficient de partage. Cette solution doit être stockée dans des conditions qui garantissent sa stabilité.

1.6.2.2. *Conditions de l'essai*

La température d'essai doit être maintenue constante (± 1 ^{o}C) et se situer dans l'intervalle compris entre 20 ^{o}C et 25 ^{o}C.

1.6.2.3. *Mesure*

1.6.2.3.1. Établissement de l'équilibre de partage

Pour chaque série de conditions d'essai, préparer en double des récipients d'essai contenant les quantités requises, mesurées avec précision, des deux solvants ainsi que la quantité nécessaire de solution de réserve.

Mesurer le volume des phases de n-Octanol. Placer les récipients d'essai dans un agitateur approprié ou les agiter à la main. Lorsqu'on utilise un tube à centrifuger, une méthode recommandée consiste à retourner rapidement le tube à 180^{o} autour de son axe transversal de telle sorte que l'air éventuellement retenu traverse les deux phases. L'expérience a montré que cinquante rotations de ce type suffisent généralement pour établir l'équilibre de partage. Pour plus de certitude, il est recommandé d'effectuer cent rotations en cinq minutes.

1.6.2.3.2. Séparation des phases

On peut, si nécessaire, centrifuger le mélange pour séparer les phases. Cette opération est effectuée à l'aide d'une centrifugeuse de laboratoire maintenue à température ambiante, ou, si l'on utilise une centrifugeuse sans contrôle de température, les tubes a centrifuger doivent être gardés à température d'essai pendant au moins une heure avant l'essai.

▼B

1.6.2.4. *Analyse*

Pour déterminer le coefficient de partage, il est nécessaire de déterminer la concentration de la substance à étudier dans les deux phases. Pour ce faire, prélever une portion de chacune des deux phases de chaque tube pour chaque série de conditions d'essai et les analyser suivant le procédé choisi. La quantité totale de substance présente dans les deux phases doit être calculée et comparée avec la quantité de substance initialement introduite.

La phase aqueuse doit être échantillonnée selon un procédé réduisant au minimum le risque d'inclusion de traces de n-Octanol: on peut utiliser à cet effet une seringue en verre à aiguille interchangeable. Tout d'abord remplir partiellement la seringue d'air, lequel est ensuite expulsé doucement, tout en insérant l'aiguille dans la couche de n-Octanol. Prélever un volume adéquat de phase aqueuse. Retirer rapidement la seringue de la solution et enlever l'aiguille. Le contenu de la seringue pourra alors être utilisé comme échantillon aqueux. La concentration doit être déterminée dans les deux phases distinctes de préférence par un procédé spécifique à la substance. Exemples de méthodes analytiques susceptibles de convenir:

— méthodes photométriques,

— chromatographie en phase gazeuse,

— chromatographie en phase liquide haute performance.

1.6.3. **Méthode HPLC**

1.6.3.1. *Préparation*

Appareil

Il est nécessaire de disposer d'un chromatographe à phase liquide, muni d'une pompe à débit régulier et d'un dispositif de détection approprié. Il est recommandé d'utiliser une valve à injection portant des boucles à injection. La présence de groupes polaires dans la phase stationnaire peut entraver considérablement le fonctionnement de la colonne d'HPLC. C'est pourquoi les phases stationnaires doivent contenir un minimum de groupes polaires (11). On peut utiliser des phases inverses à microparticules ou des colonnes prêtes à l'emploi vendues dans le commerce. Une colonne de sécurité peut être placée entre le système d'injection et la colonne analytique.

Phase mobile

Le solvant d'élution est préparé avec du méthanol et de l'eau de qualité HPLC et dégazé avant utilisation. Il convient d'employer une élution isocratique et d'utiliser un rapport méthanol/eau contenant un minimum de 25 % d'eau. Normalement, un mélange méthanol-eau 3:1 (v/v) convient pour éluer des composés de log P 6 en moins d'une heure, à un débit de 1 millilitre/minute. Pour les composés dont le log P est élevé, il peut être nécessaire de réduire le temps d'élution et celui des composés de référence en diminuant la polarité de la phase mobile ou la longueur de la colonne.

Les substances très peu solubles dans le n-Octanol ont tendance à donner des valeurs de log P_{ow} anormalement basses avec la méthode HPLC; les pics formés par ces composés font parfois partie du front du solvant. Ce phénomène est probablement dû au fait que le processus de partage est trop lent pour atteindre l'équilibre dans un laps de temps normal pour une séparation par HPLC. Pour parvenir à une valeur fiable, il peut être utile de diminuer le débit ou le rapport méthanol/eau.

▼B

Les substances à tester et les composés de référence doivent être solubles, dans la phase mobile, à des concentrations suffisantes pour permettre leur détection. On ne peut employer d'additifs avec le mélange méthanol-eau que dans des cas exceptionnels, car ils modifient les propriétés de la colonne. Les chromatogrammes avec additifs doivent obligatoirement être effectués avec une autre colonne du même type. Si le mélange méthanol-eau n'est pas approprié, on peut utiliser d'autres mélanges solvant organique-eau, par exemple éthanol-eau ou acétonitrile-eau.

Le pH de l'éluant est d'une importance capitale pour les composés ionisables. Il doit se situer dans l'intervalle de pH auquel fonctionne la colonne, qui est habituellement compris entre 2 et 8. Il est recommandé de tamponner. Il faut prendre soin d'éviter la précipitation saline et la détérioration de la colonne qui se produisent avec certains mélanges phase organique/tampon. Il n'est pas recommandé d'effectuer des mesures de HPLC avec des phases stationnaires à base de silice à un pH supérieur à 8 parce qu'une phase mobile alcaline peut altérer rapidement le fonctionnement de la colonne.

Solutés

Les composés de référence doivent être les plus purs possibles. Les composés utilisés à des fins d'essai ou d'étalonnage sont, si possible, dissous dans la phase mobile.

Conditions de l'essai

La température ne doit pas varier de plus de ± 2 K pendant les mesures.

1.6.3.2. **Mesure**

Calcul du temps mort t_0

Le temps mort t_0 peut être déterminé en utilisant soit une série d'homologues (par exemple n-alkyl-méthyl-cétones) soit des composés organiques non retenus (par exemple thiourée ou formamide). Pour calculer le temps mort (t_0) à l'aide d'une série homologue, il faut injecter un jeu d'au moins 7 membres d'une série homologue et déterminer leurs temps de rétention respectifs. Les temps de rétention bruts $t_{r(n_c + 1)}$ sont tracés en fonction de $t_{r(n_c)}$. L'intersection a et la pente b de l'équation de régression:

$$t_{r(nc + 1)} = a + b\ t_{r(nc)}$$

sont déterminés (n_c = nombre d'atomes de carbone). Le temps mort est défini par l'équation suivante

$$t_0 = a/(1 - b)$$

▼B

Courbe d'étalonnage

L'étape suivante consiste à construire une courbe de corrélation entre log k et log P pour des composés de référence appropriés. En pratique, il s'agit d'injecter simultanément un jeu de cinq à dix composés de référence standard dont le log P est proche de la gamme prévue et de déterminer les temps de rétention, de préférence sur un intégrateur enregistreur lié au système de détection. Les logarithmes des facteurs de capacité, log k, correspondants sont calculés et tracés en fonction du log P déterminé avec la méthode par agitation en flacon. L'étalonnage est effectué à intervalles réguliers, au moins une fois par jour, afin de pouvoir tenir compte de changements éventuels du fonctionnement de la colonne.

Détermination du facteur de capacité de la substance à tester

Injecter la substance à tester dans une quantité aussi petite que possible de phase mobile. Déterminer (en double) le temps de rétention qui permet de calculer le facteur de capacité k. Le coefficient de partage de la substance à tester peut être déduit par interpolation à partir de la courbe de corrélation des produits de référence. Une extrapolation s'impose pour les coefficients de partage très faibles ou très élevés. Il faut alors accorder une attention particulière aux limites de confiance de la courbe de régression.

2. **DONNÉES**

Méthode par agitation en flacon

La fiabilité des valeurs de P ainsi déterminées peut être vérifiée en procédant à une comparaison de la moyenne des déterminations effectuées en double avec la moyenne générale.

3. **RÉSULTATS**

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

— les spécifications précises de la substance (identité et impuretés) et, s'il y a lieu, l'étape de purification préliminaire,

— si les méthodes ne sont pas applicables (par exemple substance tensioactive), il convient de fournir une valeur calculée ou estimée à partir des solubilités individuelles dans l'eau ou le n-Octanol,

— toutes les informations et remarques pertinentes pour l'interprétation des résultats doivent être signalées, en particulier les impuretés et l'état physique de la substance.

Pour la méthode par agitation en flacon:

— les résultats de l'estimation préliminaire, s'il y a lieu,

— la température à laquelle est effectuée la détermination,

— les données relatives aux procédés analytiques utilisés pour déterminer les concentrations,

— le temps et la vitesse de centrifugation, s'il y a lieu,

▼B

— les concentrations mesurées dans les deux phases pour chaque détermination (cela signifie qu'un total de douze concentrations doit être consigné),

— le poids de la substance à étudier, le volume de chaque phase utilisée dans chaque récipient à essai et la quantité totale calculée de substance à étudier présente dans chaque phase une fois l'équilibre atteint,

— les valeurs calculées du coefficient de partage (P) et la moyenne doivent être mentionnées pour chaque série de conditions d'essai ainsi que la moyenne de l'ensemble des déterminations. Toute indication de dépendance du coefficient de partage vis-à-vis de la concentration doit être mentionnée,

— la déviation standard des valeurs individuelles de P par rapport à leur moyenne,

— la moyenne P de l'ensemble des déterminations exprimée par son logarithme (base 10),

— la valeur théorique calculée de P_{ow}, si elle a été déterminée, ou si la valeur mesurée est > 10^4,

— le pH de l'eau utilisée et de la phase aqueuse pendant l'expérience,

— si l'eau est remplacée par un tampon, justifier son utilisation, et donner sa composition sa concentration et son pH ainsi que le pH de la phase aqueuse avant et après l'expérience.

Pour la méthode par HPLC:

— le résultat de l'estimation préliminaire, s'il y a lieu,

— les substances à étudier et les substances de référence ainsi que leur degré de pureté,

— la gamme de température à laquelle sont effectuées les déterminations,

— le pH auquel sont effectuées les déterminations,

— une description détaillée de la colonne analytique et de la colonne de sécurité ainsi que de la phase mobile et des moyens de détection,

— des données relatives à la rétention et les valeurs de log P citées dans la littérature pour les composés de référence utilisés pour l'étalonnage,

— une description détaillée de la ligne de régression ajustée (log k en fonction de log P),

— des données relatives à la rétention moyenne et à la valeur interpolée de log P pour le composé à étudier,

— une description du matériel et des conditions expérimentales,

— les profils d'élution,

— les quantités de produit à étudier et de substances de référence introduites dans la colonne,

— le temps mort et la méthode utilisée pour le calculer.

▼B

4. **RÉFÉRENCES**

(1) OCDE, Paris, 1981, Ligne directrice n° 107, décision du Conseil C(81) 30 final.

(2) C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

(3) Log P and Parameter Database, A tool for quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman; A.J. Leo. dir.) — Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.

(4) L. Renberg, G. Sundström and K. Dundh-Nygärd, Chemosphere, 1980, vol. 80, 683.

(5) H. Ellgehausen. C. D'Hondt and R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, 219.

(6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, 73.

(7) W.E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247, 1.

(8) J.E. Haky and A.M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, 675.

(9) S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed Mat. Res., 1981, vol. 15, 787.

(10) O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumpraxis (édité par E. Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/1, 223-339.

(11) R.F. Rekker and H.M. de Kort, Euro. J. Med. Chem., 1979, vol. 14, 479.

(12) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses, Chem Rev., 1971, vol. 71, 525.

(7) (13) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmentai Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.

(14) NF T 20-043 AFNOR (1985). Produits chimiques à usage industriel — Détermination du coefficient de partage — Méthode par agitation en flacon.

(15) C.V. Eadsforth and P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

(16) A. Leo, C.Hansch and D. Elkins, Chem. Rev, 1971, vol. 71, 525.

(17) C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K. H. Kim, D. Nikaitam and E. J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, 1207.

(18) W.B. Neely, D.R. Branson and G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, 1113.

(19) D.S. Brown and E.W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, 382.

(20) J.K. Seydel and K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York, 1979.

▼B

(21) R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam, 1984.

(22) Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Basel, 1978.

(23) N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19, 615.

▼B

Annexe

METHODES DE CALCUL/ESTIMATION

INTRODUCTION

Une introduction générale aux méthodes de calcul des données et des exemples figurent dans le «Handbook of Chemical Property Estimation Methods» (a).

Les valeurs calculées du P_{ow} peuvent servir:

— à choisir la méthode expérimentale appropriée (gamme pour la méthode par agitation du flacon: log P_{ow}: de - 2 à 4 T; gamme pour l'HPLC: log P_{ow}: de 0 à 6),

— à déterminer les conditions d'essai appropriées (par exemple, les substances de référence pour l'HPLC, le rapport de volume n-Octanol/eau pour la méthode par agitation du flacon),

— de contrôle propre au laboratoire relatif aux erreurs expérimentales éventuelles,

— à fournir une estimation de P_{ow} au cas où les méthodes expérimentales ne peuvent être appliquées pour des raisons techniques.

MÉTHODES D'ESTIMATION

Estimation préliminaire du coefficient de partage.

La valeur du coefficient de partage peut être estimée à l'aide de la solubilité de la substance à tester dans les solvants purs:

$$P_{\text{estimé}} = \frac{\text{saturation } C_{\text{n- Octanol}}}{\text{saturation } C_{\text{eau}}}$$

MÉTHODES DE CALCUL

Principe des méthodes de calcul

Toutes les méthodes de calcul reposent sur la fragmentation formelle de la molécule en sous-structures appropriées pour lesquelles on dispose de données précises concernant le log P_{ow}. Le log P_{ow} de la molécule entière est alors calculé en ajoutant la somme des valeurs des fragments correspondantes et la somme des termes de correction pour les interactions moléculaires.

Il existe des listes de constantes de fragments et de termes de correction (b) (c) (d) (e) dont certaines sont régulièrement mises à jour (b).

Critères de qualité

En général, la fiabilité de la méthode de calcul est inversement proportionnelle à la complexité du composé étudié. Dans le cas de molécules simples, dont le poids moléculaire est faible et qui contiennent un ou deux groupes fonctionnels, on peut prévoir une déviation de 0,1 à 0,3 unité de log P entre les résultats obtenus à l'aide de différentes méthodes de fragmentation et la valeur mesurée. La marge d'erreur peut être plus importante dans le cas de molécules plus complexes. Cette marge d'erreur dépend de l'existence des constantes de fragments et de leur fiabilité ainsi que de la possibilité d'identifier les interactions intramoléculaires (par exemple les liaisons hydrogènes) et de l'utilisation correcte des termes de correction (ce qui ne pose aucune difficulté avec un logiciel informatique CLOGP-3) (b). Dans le cas des composés ionisables, il est important de prendre en considération la charge ou le degré d'ionisation.

▼B

Calcul

Méthode π de Hansch

La constante du substituant hydrophobe d'origine, π, établie par Fujita et al. (f) est définie comme suit:

$\pi_x = \log P_{ow}$ (PhX) - $\log P_{ow}$ (PhH)

où P_{ow} (PhX) est le coefficient de partage d'un dérivé aromatique et P_{ow} (PhH), celui du composé parent;

(par exemple $\pi_{Cl} = \log P_{ow} (C_6H_5Cl) - \log P_{ow} (C_6H_6) = 2,84 - 2,13 = 0,71$).

Conformément à sa définition la méthode π s'applique surtout à la substitution aromatique. Les valeurs de π d'un grand nombre de substituants ont été rassemblées (b) (c) (d). Elles sont utilisées pour calculer le log P de molécules aromatiques ou de sous-structures.

Méthode de Rekker

Selon Rekker (g), la valeur de $\log P_{ow}$ est calculée de la manière suivante:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j$$

où f_i représente les constantes des divers fragments moléculaires et a_i leur fréquence dans la molécule à l'étude. Les termes de corrections peuvent être exprimés sous la forme du multiple entier d'une constante unique C_m (appelée «constante magique»). Les constantes de fragments f_i et C_m ont été déterminées à partir d'une liste de 1 054 valeurs de P_{ow} obtenues expérimentalement (825 composés) à l'aide d'une analyse de régression multiple (c) (h). La détermination des termes d'interaction est effectuée conformément aux règles établies décrites dans la littérature (e) (h) (i).

Méthode de Hansch-Leo

Selon Hansch et Léo (c), la valeur de $\log P_{ow}$ est calculée à l'aide de l'équation suivante:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

où f_i représente les constantes des divers fragments moléculaires, F_j les termes de correction et a_i et b_j les fréquences correspondantes. Une liste de valeurs de fragments (atomes ou groupes) a été déterminée par essai et erreur à partir de valeurs expérimentales de $P_{ow,}$ ainsi qu'une liste de termes de correction F_j (appelés «facteurs»). Les termes de correction ont été classés en plusieurs classes (a) (c). Il est relativement long et compliqué de tenir compte de toutes les règles et de tous les termes de correction mais des logiciels ont été mis au point (b).

Méthode mixte

Le calcul de $\log P_{ow}$ pour des molécules complexes peut être considérablement amélioré si l'on découpe la molécule en infrastructures de plus grande dimension, pour lesquelles on dispose de valeurs de $\log P_{ow}$ fiables, provenant soit de tableaux (b) (c) soit de mesures. De tels fragments (par exemple des hétérocycles, anthraquinone, azobenzène) peuvent être associés avec les valeurs de π définies selon Hansch ou avec les constantes de fragments définies par Rekker ou par Leo.

Observations

i) Les méthodes de calcul ne s'appliquent qu'à des composés partiellement ou totalement ionisés lorsqu'il est possible de tenir compte des facteurs de correction nécessaires.

▼B

ii) Si les liaisons hydrogène intramoléculaires peuvent être déterminées, les termes de correction correspondants (de + 0,6 à + 1,0 unité log P) doivent être ajoutés (a). Les modèles stériques ou les données spectroscopiques relatives à la molécule peuvent indiquer la présence de telles liaisons.

iii) Si plusieurs formes tautomériques sont possibles, les calculs doivent être basés sur la forme la plus probable.

iv) Les révisions des listes de constantes de fragments doivent être soigneusement suivies.

Procès-verbal

Lors de l'utilisation de méthodes de calcul/estimation. Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

— description de la substance (mélange, impuretés, etc.),

— indication concernant toute liaison hydrogène intramoléculaire possible, charge, ou tout effet inhabituel (par exemple tautomérisme),

— description de la méthode de calcul,

— identification ou base de données,

— particularités du choix des fragments,

— documentation détaillée du calcul.

RÉFÉRENCES

(a) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York, 1983.

(b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(c) C. Hansch, A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

(d) A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. — Chim Ther., 1979, vol. 14, 479.

(f) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc, 1964, vol. 86, 5175

(g) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Elsevier, New York, 1977.

(h) C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

(i) R.A. Scherrer, ACS — American Chemical Society, Washington, D.C. 1984, Symposium Series 255, p. 225.

▼B

Annexe II

Substances de référence recommandées pour la méthode HPLC

N°	Substance de référence	Log P_{ow}	pKa
1	2-butanone	0,3	
2	4-acétylpyridine	0,5	
3	aniline	0,9	
4	acétaniline	1,0	
5	alcool benzylique	1,1	
6	p-méthoxyphénol	1,3	pKa = 10,26
7	acide phénoxy-acétique	1,4	pKa = 3,12
8	phénol	1,5	pKa = 9,92
9	dinitrophénol	1,5	pKa = 3,96
10	benzonitrile	1,6	
11	phénylacétonitrile	1,6	
12	alcool 4-méthylbenzylique	1,6	
13	acécophénone	1,7	
14	2-nitrophénol	1,8	pKa = 7,17
15	acide 3-nitrobenzoïque	1,8	pKa = 3,47
16	4-chloraniline	1,8	pKa = 4,15
17	nitrobenzène	1,9	
18	alcool cinnamique	1,9	
19	acide benzoïque	1,9	pKa = 4,19
20	p-crésol	1,9	pKa = 10,17
21	acide cinnamique	2,1	pKa = 3,89 cis pKa = 4,44 trans
22	anisole	2,1	
23	méthylbenzoate	2,1	
24	benzène	2,1	
25	acide méthylbenzoïque	2,4	pKa = 4,27
26	chlorophénol	2,4	pKa = 9,1
27	trichloréthylène	2,4	
28	atrazine	2,6	
29	éthylbenzoate	2,6	
30	2,6-dichlorobenzonitrile	2,6	
31	acide chlorobenzoïque	2,7	pKa = 3,82
32	toluène	2,7	
33	naphtol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3 dichloroaniiine	2,8	
35	chlorobenzène	2,8	
36	allyl-phényléther	2,9	
37	bromobenzène	3,0	

▼B

Nº	Substance de référence	Log P_{ow}	pKa
38	éthylbenzène	3,2	
39	benzophénone	3,2	
40	4-phénylphénone	3,2	pKa = 9,54
41	thymol	3,3	
42	1,4-dichlorobenzène	3,4	
43	diphénylamine	3,4	pKa = 0,79
44	naphtalène	3,6	
45	phénylbenzoate	3,6	
46	isopropylbenzène	3,7	
47	2,4,6-trichlorophénol	3,7	pKa = 6
48	biphényl	4,0	
49	benzylbenzoate	4,0	
50	2,4-dinitro-6sec.butylphénol	4,1	
51	1,2,4-trichlorobenzène	4,2	
52	acide dodécanoïque	4,2	
53	diphényléther	4,2	
54	n-butylbenzène	4,5	
55	phénanthrène	4,5	
56	fluoranthène	4,7	
57	dibenzyl	4,8	
58	2,6-diphénylpyridine	4,9	
59	triphénylamine	5,7	
60	DDT	6,2	
	Autre substance de référence dont le log P_{ow} est faible		
1	acide nicotinique	- 0,07	

▼B

A.9. **POINT D'ÉCLAIR**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Pour réaliser cet essai, il est utile de disposer d'informations préliminaires sur l'inflammabilité de la substance. Le mode opératoire est applicable aux substances liquides dont les vapeurs peuvent être enflammées par des sources d'inflammation. Les méthodes d'essai énumérées dans le présent document ne sont valables que pour les intervalles de point d'éclair spécifiés dans les méthodes individuelles.

Il convient de tenir compte dans le choix de la méthode des réactions chimiques éventuelles entre la substance et le support de l'échantillon.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Le point d'éclair est la température la plus basse, corrigée pour une pression de 101,325 kPa, à laquelle le liquide d'essai dégage des vapeurs, dans les conditions définies dans la méthode d'essai, en quantité telle qu'il en résulte dans le récipient d'essai un mélange vapeur/air inflammable.

Unités: ^{o}C

$t = T - 273,15$

(t est exprimé en ^{o}C et T en K)

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Il n'est pas nécessaire d'employer des substances de référence dans tous les cas où l'on étudie une nouvelle substance. Elles devraient servir en premier lieu à vérifier de temps à autre la fiabilité de la méthode et à permettre de comparer les résultats obtenus avec différentes méthodes.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La substance est placée dans un récipient d'essai que l'on chauffe ou que l'on refroidit à la température d'essai, suivant le mode opératoire décrit dans la méthode d'essai individuel. Des essais d'inflammation doivent être effectués afin de s'assurer que la substance dégage ou non des vapeurs inflammables à la température d'essai,

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

1.5.1. **Répétabilité**

La répétabilité dépend de l'intervalle de point d'éclair et de la méthode d'essai utilisée; maximum 2 ^{o}C.

1.5.2. **Sensibilité**

La sensibilité dépend de la méthode d'essai utilisée.

1.5.3. **Spécificité**

La spécificité de certaines méthodes d'essai est limitée à certains intervalles de point d'éclair et dépend de données relatives à la substance (par exemple haute viscosité).

▼B

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Préparation**

Un échantillon de la substance à tester est placé dans un appareil d'essai conforme aux points 1.6.3.1 ou 1.6.3.2.

Par mesure de sécurité, il est conseillé d'utiliser pour les substances énergétiques ou toxiques, une méthode n'exigeant qu'un échantillon de petite taille (2 cm^3 environ).

1.6.2. **Conditions d'essai**

L'appareil doit, dans la limite des règles de sécurité, être placé à l'abri des courants d'air.

1.6.3. **Mode opératoire**

1.6.3.1. *Méthode de l'équilibre*

Voir normes ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2. *Méthode du non-équilibre*

Appareil d'Abel:

Voir normes BS 2000 partie 170, NF M07-011, NF T66-009.

Appareil d'Abel-Pensky:

Voir normes EN 57, DIN 51755 partie 1 (pour des températures de 5 à 65 °C), DIN 51755 partie 2 (pour des températures inférieures à 5 °C), NF M07-036.

Appareil Tag:

Voir norme ASTM D 56.

Appareil de Pensky-Martens:

Voir normes ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34, NF M07-019.

Observations:

Lorsque le point d'éclair, déterminé par une méthode basée sur le non-équilibre (point 1.6.3.2.), a une valeur de 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C ou 55 ± 2 °C, il importe de confirmer cette valeur par une méthode basée sur l'équilibre en utilisant le même appareil.

Seules les méthodes susceptibles de donner la température du point d'éclair peuvent être utilisées pour une notification.

Pour déterminer le point d'éclair des liquides visqueux (peintures, gommes et substances similaires) contenant des solvants, il ne faut utiliser que des appareils et des méthodes d'essai permettant de déterminer le point d'éclair des liquides visqueux.

Voir normes ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 partie 1.

▼B

2. **DONNÉES**

3. **RÉSULTATS**

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

— les spécifications précises de la substance (identité et impuretés),

— la méthode utilisée ainsi que toute variante éventuelle,

— les résultats et toute observation supplémentaire pertinente pour l'interprétation des résultats.

4. **RÉFÉRENCES**

Aucune.

▼B

A.10. INFLAMMABILITÉ (SOLIDES)

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

Avant de procéder à cet essai, il est utile de disposer d'informations préliminaires sur les propriétés explosives potentielles de la substance.

Cet essai ne doit être appliqué qu'aux substances poudreuses, granuleuses ou pâteuses.

De façon à ne pas englober toutes les substances susceptibles d'être enflammées, mais uniquement celles qui brûlent rapidement ou celles dont la combustion est particulièrement dangereuse d'une façon ou d'une autre, ne sont considérées comme très inflammables que les substances dont la vitesse de combustion dépasse une certaine limite.

La propagation de l'incandescence dans une poudre métallique peut être particulièrement dangereuse en raison des difficultés que présente l'extinction du feu. Les poudres métalliques sont considérées comme très inflammables si l'incandescence se propage dans tout l'échantillon en un temps déterminé.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Le temps de combustion est exprimé en secondes.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Non spécifiées.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La substance est disposée de manière à former une bande ininterrompue ou une traînée de poudre d'environ 250 mm de longueur. Un essai préliminaire est effectué afin de déterminer si, par allumage à la flamme d'un brûleur à gaz, il se produit une propagation de la combustion avec ou sans flamme. Si la combustion se propage sur une distance de plus de 200 mm en un temps déterminé, un essai complet est effectué pour déterminer la vitesse de combustion.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

Non établis.

▼B

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Essai préliminaire**

La substance est disposée en bande ininterrompue ou en traînée de poudre d'environ 250 mm de longueur par 20 mm de largeur et 10 mm de hauteur sur une plaque non combustible, non poreuse et peu thermoconductrice. La flamme chaude d'un brûleur à gaz (diamètre minimum 5 mm) est appliquée à l'une des extrémités de la traînée de poudre jusqu'à ce que celle-ci s'enflamme, ou pendant un maximum de 2 minutes (5 minutes pour les poudres métalliques ou d'alliages métalliques). Noter si la combustion se propage le long de la traînée sur une distance de 200 mm pendant une durée d'essai de 4 minutes (40 minutes pour les poudres métalliques). Si la substance ne s'enflamme pas et ne propage pas la combustion, avec ou sans flamme, sur une distance de 200 mm pendant une durée d'essai de 4 minutes (ou 40 minutes), la substance n'est pas considérée comme très inflammable, et il n'est pas nécessaire de poursuivre l'essai. Si la combustion de la substance se propage sur une distance de 200 mm sur la traînée de poudre en moins de 4 minutes (ou de 40 minutes pour les poudres métalliques), le mode opératoire décrit ci-dessous (aux points 1.6.2 et suivants) doit être suivi.

1.6.2. **Essai de vitesse de combustion.**

1.6.2.1. *Préparation*

Les substances poudreuses ou granuleuses sont versées en vrac dans un moule de 250 mm de longueur et de section transversale triangulaire dont la hauteur et la largeur intérieure sont respectivement de 10 et 20 millimètres. Disposer de part et d'autre du moule, dans le sens de la longueur, deux plaques métalliques destinées à jouer le rôle de supports latéraux. Ces plaques dépassent de 2 mm le bord supérieur de la section triangulaire transversale (voir figure). Ensuite, laisser tomber trois fois le moule d'une hauteur de 2 cm sur une surface dure. Rajouter de la substance s'il y a lieu. Enlever ensuite les plaques latérales et racler le trop-plein. Placer une plaque non combustible, non poreuse et peu thermoconductrice sur le moule, retourner l'ensemble et démouler.

Les substances pâteuses sont étalées sur une plaque non combustible, non poreuse et peu thermoconductrice sous la forme d'un cordon de 250 mm de longueur et d'environ 1 cm^2 de section transversale.

1.6.2.2. *Conditions d'essai*

Dans le cas de substances sensibles à l'humidité, effectuer l'essai le plus vite possible après avoir retiré la substance de son récipient.

1.6.2.3. *Mode opératoire*

Disposer le tas dans une hotte, perpendiculairement au sens du courant d'air.

La vitesse de l'air doit suffire à empêcher la fumée de se répandre dans le laboratoire et ne doit pas être modifiée au cours de l'essai. Le flux d'air doit former un écran qui entoure l'appareil.

L'une des extrémités du tas est enflammée à l'aide de la flamme chaude d'un brûleur à gaz (diamètre minimal 5 mm). Lorsque le tas a brûlé sur une distance de 80 mm, mesurer la vitesse de combustion sur les 100 mm suivants.

▼B

Répéter l'essai six fois, en utilisant chaque fois une plaque propre et froide, à moins d'observer un résultat positif avant.

2. **DONNÉES**

Le temps de combustion observé lors de l'essai préliminaire (1.6.1) et le temps de combustion le plus court observé au cours de l'essai (1.6.2.3) sont pertinents pour l'évaluation.

3. **RÉSULTATS**

3.1. PROCÈS-VERBAL

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

— les spécifications précises de la substance (identité et impuretés),

— une description de la substance à essayer, son état physique, y compris son taux d'humidité,

— les résultats des essais préliminaires et des essais de vitesse de combustion, si ces derniers ont été effectués,

— toute observation supplémentaire pertinente pour l'interprétation des résultats.

3.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les substances poudreuses, granuleuses ou pâteuses doivent être considérées comme très inflammables lorsque le temps de combustion observé au cours de l'un des essais effectués conformément au mode opératoire décrit au point 1.6.2 est inférieur à 45 secondes. Les poudres métalliques ou d'alliages métalliques doivent être considérées comme très inflammables lorsqu'elles peuvent être enflammées et que la flamme ou la zone de réaction s'étend à tout l'échantillon en 10 minutes ou moins.

4. **RÉFÉRENCES**

(1) NF T 20-042 (septembre 1985). Produits chimiques à usage industriel — Détermination de l'inflammabilité des solides.

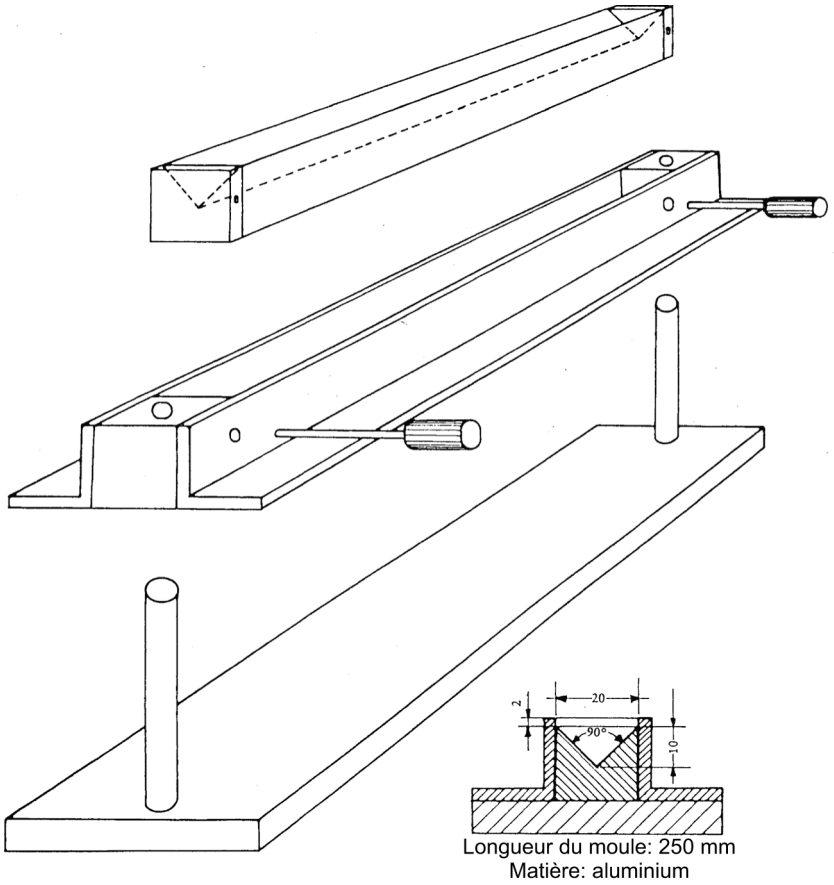
▼B

Annexe

Figure

Moule et accessoires nécessaires à la confection des tas

(toutes les dimensions sont exprimées en millimètres)



▼B

A.11. **INFLAMMABILITÉ (GAZ)**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode permet de déterminer si des gaz mélangés à l'air à température ambiante (20 °C environ) et à la pression atmosphérique sont inflammables et, s'ils le sont, dans quel intervalle de concentration. Des mélanges contenant des concentrations croissantes du gaz à tester dans de l'air sont exposés à une étincelle électrique et on observe si l'inflammation se produit.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

L'intervalle d'inflammabilité est l'intervalle de concentration entre les limites d'explosion supérieure et inférieure. Les limites d'explosion supérieure et inférieure sont les concentrations dans l'air du gaz inflammable auxquelles l'inflammation ne se propage pas.

1.3. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Non spécifiée.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La concentration du gaz dans l'air est augmentée graduellement et le mélange est exposé à une étincelle électrique à chaque étape.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

Non fixés.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Appareil**

Le récipient d'essai est un cylindre en verre d'un diamètre intérieur de 50 mm au moins et d'une hauteur de 300 mm au moins, disposé verticalement. Les électrodes d'inflammation sont distantes l'une de l'autre de 3 à 5 mm et placées à 60 mm du fond du cylindre. Le cylindre est équipé d'une soupape. L'appareil doit être protégé par un blindage pour limiter les dégâts d'une explosion éventuelle.

La source d'inflammation est une étincelle inductive entretenue d'une durée de 0,5 seconde, produite par un transformateur à haute tension avec une tension de sortie de 10 à 15 kV (la puissance maximale est de 300 W). Un modèle d'appareil approprié est décrit dans la référence (2).

1.6.2. **Conditions d'essai**

L'essai doit avoir lieu à température ambiante (20 °C environ).

▼B

1.6.3. **Mode opératoire**

Remplir le cylindre en verre d'un mélange air-gaz de concentration connue à l'aide de pompes doseuses. Faire jaillir une étincelle au travers de ce mélange et observer si une flamme se détache de la source d'inflammation et se propage de manière indépendante. La concentration du gaz est modifiée par étapes de 1 % en volume jusqu'à ce que l'inflammation décrite ci-dessus se produise.

Si la structure chimique du gaz laisse supposer qu'il doit être ininflammable et s'il est possible de calculer la composition du mélange stœchiométrique avec l'air, ne soumettre à essai, par étapes de 1 %, que des mélanges dans une gamme comprise entre 10 % de moins que la composition stœchiométrique et 10 % de plus.

2. **DONNÉES**

La propagation de la flamme constitue la seule donnée d'information valable pour la détermination de cette propriété.

3. **RÉSULTATS**

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

— les spécifications précises de la substance (identité et impuretés),

— une description, incluant les dimensions, de l'appareil utilisé,

— la température à laquelle l'essai a été réalisé,

— les concentrations d'essai ainsi que les résultats obtenus,

— le résultat de l'essai: gaz ininflammable ou très inflammable,

— lorsque l'on conclut à l'ininflammabilité, il convient de préciser l'intervalle de concentration sur lequel a porté l'essai, par étapes de 1 %,

— toute information et observation pertinente pour l'interprétation des résultats.

4. **RÉFÉRENCES**

(1) NF T 20-041 (septembre 1985). Produits chimiques à usage industriel — Détermination de l'inflammabilité des gaz.

(2) W.Berthold, D.Conrad, T.Grewer, H.Grosse-Wortmann, T.Redeker und H.Schacke. «Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen». Chem.-Ing.-Tech., 1984, vol. 56, 2, 126-127.

▼B

A.12. **INFLAMMABILITÉ (AU CONTACT DE L'EAU)**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Cette méthode d'essai peut être utilisée pour déterminer si la réaction d'une substance avec l'eau ou l'air humide entraîne le dégagement d'une quantité dangereuse d'un gaz ou de plusieurs gaz, susceptibles d'être très inflammables.

Elle peut être appliquée à la fois aux substances solides et liquides mais non aux substances qui s'enflamment spontanément au contact de l'air.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Très inflammables: substances qui, au contact de l'eau ou de l'air humide, dégagent une quantité dangereuse de gaz très inflammables à raison d'un débit minimal de 1 litre/kg par heure.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

L'essai de la substance comporte plusieurs phases décrites ci-après; si l'inflammation intervient à une quelconque de ces phases, il n'est pas nécessaire de poursuivre l'essai. Si on sait que la substance ne réagit pas violemment avec l'eau, procéder à la phase 4 (voir 1.3.4).

1.3.1. **Phase 1**

Placer la substance à tester dans un bac contenant de l'eau distillée à 20 °C et noter si le gaz s'enflamme ou non.

1.3.2. **Phase 2**

Placer la substance à tester sur un papier filtrant flottant sur de l'eau distillée à 20 °C contenue dans une capsule et noter si le gaz qui se dégage s'enflamme ou non. Le papier-filtre ne sert qu'à maintenir la substance en place, ce qui accroît les probabilités d'inflammation.

1.3.3. **Phase 3**

Mettre la substance à tester en tas sur une hauteur de 2 cm et un diamètre de 3 cm environ. Ajouter quelques gouttes d'eau au tas ainsi constitué et noter si le gaz qui se dégage s'enflamme ou non.

1.3.4. **Phase 4**

Mélanger la substance d'essai avec de l'eau distillée a 20 °C et mesura le débit du gaz pendant 7 heures, à intervalles d'une heure. Si ce débit est variable ou s'il s'accroît après 7 heures, le temps de mesure doit être prolongé jusqu'à 5 jours au maximum. L'essai peut être arrêté si le débit excède 1 l/kg par heure à un moment donné.

▼B

1.4. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Non spécifiée.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

Non indiqués.

1.4. 1.6. DESCRIPTION DES MÉTHODES

1.6.1. **Phase 1**

1.6.1.1. *Conditions de l'essai*

L'essai est effectué à température ambiante (20 °C, environ).

1.6.1.2. *Mode opératoire*

Placer une petite quantité (approximativement 2 mm de diamètre) de la substance à tester dans un bac contenant de l'eau distillée. Noter si: i) il y a dégagement de gaz, ii) le gaz s'enflamme. Si le gaz s'enflamme, il est inutile de poursuivre l'essai de la substance, celle-ci étant dès lors considérée comme substance dangereuse.

1.6.2. **Phase 2**

1.6.2.1. *Appareil*

Papier-filtre flottant sur la surface de l'eau distillée dans un récipient approprié, par exemple une capsule de 100 mm de diamètre.

1.6.2.2. *Conditions de l'essai*

L'essai est effectué à température ambiante (20 °C, environ).

1.6.2.3. *Mode opératoire*

Placer une petite quantité (approximativement 2 mm de diamètre) de la substance à tester au centre du papier-filtre. Noter si: i) il y a dégagement de gaz, ii) le gaz s'enflamme. Si le gaz s'enflamme, il est inutile de poursuivre l'essai de la substance, celle-ci étant dès lors considérée comme substance dangereuse.

1.6.3. **Phase 3**

1.6.3.1. *Conditions de l'essai*

L'essai est effectué à température ambiante (20 °C, environ).

1.6.3.2. *Mode opératoire*

Mettre la substance à tester en tas sur une hauteur de 2 cm et un diamètre de 3 cm environ en aménageant au sommet un petit cratère. Ajouter quelques gouttes d'eau dans le creux. Noter si: i) il y a dégagement de gaz, ii) le gaz s'enflamme. Si le gaz s'enflamme, il est inutile de poursuivre l'essai de la substance, celle-ci étant dès lors considérée comme substance dangereuse.

▼B

1.6.4. **Phase 4**

1.6.4.1. *Appareil*

L'appareil est monté comme indiqué sur la figure.

1.6.4.2. *Conditions de l'essai*

S'assurer que le récipient contenant la substance à tester est exempt de particules pulvérulentes (< 500 5m). Si celles-ci représentent plus de 1 % en poids du total, ou si l'échantillon est friable, réduire la substance en poudre avant de procéder à l'essai, afin de réduire la dimension des particules pendant le stockage et la manutention; sinon, la substance est utilisée telle qu'elle est reçue. L'essai doit être réalisé à température ambiante (20 ^{o}C environ) et à pression atmosphérique.

1.6.4.3. *Mode opératoire*

Verser de 10 à 20 ml d'eau dans l'entonnoir à robinet de l'appareillage et placer 10 g de substance dans la fiole conique. Le volume de gaz qui se dégage peut être mesuré par tout moyen approprié. Ouvrir le robinet de l'entonnoir pour laisser pénétrer l'eau dans la fiole conique et déclencher un chronomètre. Le dégagement gazeux est mesuré toutes les heures pendant sept heures. Si, pendant cette période, le dégagement gazeux devient irrégulier, ou si, à la fin de cette période, son débit augmente, il convient de poursuivre les mesures pendant cinq jours. Si, à un moment quelconque des mesures, le débit du dégagement gazeux excède 1 litre/kg par heure, l'essai peut être interrompu. L'essai doit être réalisé en triple.

Si l'identité chimique du gaz est inconnue, celui-ci doit être analysé. Si le gaz contient des constituants très inflammables, ou si l'on ignore si l'ensemble du mélange est très inflammable, préparer et essayer un mélange de même composition conformément à la méthode d'essai (A.11).

2. **DONNÉES**

La substance est considérée comme dangereuse si:

— une inflammation spontanée intervient lors d'une phase quelconque du déroulement de l'essai,

— un gaz inflammable se dégage à un débit supérieur à 1 litre/kg de substance par heure.

3. **RÉSULTATS**

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

— les spécifications précises de la substance (identité et impuretés),

— une description détaillée de toute préparation préalable de la substance à essayer,

▼B

— les résultats de l'essai (phases 1, 2, 3 et 4),

— l'identité chimique du gaz qui se dégage,

— le débit du dégagement gazeux, si la phase 4 (1.6.4) est effectuée,

— le résultat de l'essai: gaz ininflammable ou très inflammable,

— toute observation supplémentaire pertinente pour l'interprétation des résultats.

4. **RÉFÉRENCES**

(1) Recommandations relatives au transport des marchandises dangereuses. Épreuves et critères, 1990, Nations unies, New York.

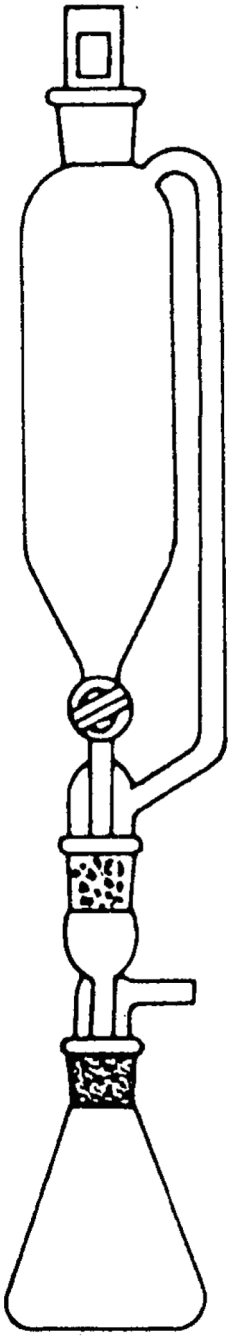
(2) NF T 20-040 (septembre 1985), Produits chimiques à usage industriel. Détermination de l'inflammabilité des gaz engendrés par hydrolyse des produits solides et liquides.

▼B

Annexe

Figure

Appareillage



▼B

A.13. **PROPRIÉTÉS PYROPHORIQUES DES SOLIDES ET DES LIQUIDES**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Cet essai est applicable aux substances solides et liquides, qui, en petite quantité, s'enflamment spontanément, peu de temps après être entrées en contact avec l'air à température ambiante (20 °C environ).

Les substances dont l'inflammation spontanée n'intervient qu'après une exposition de plusieurs heures ou de plusieurs jours à température ambiante, ou à des températures élevées, ne sont pas couvertes par cette méthode d'essai.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Les substances sont considérées comme ayant des propriétés pyrophores si elles s'enflamment ou causent la carbonisation dans les conditions décrites au point 1.6.

L'auto-inflammabilité des liquides peut également exiger d'être évaluée selon la méthode A.15 (température d'inflammation spontanée des liquides et des gaz).

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Non spécifiées.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La substance, solide ou liquide, est ajoutée à un porteur inerte et mise en contact avec l'air à température ambiante pendant une période de cinq minutes. Si les substances liquides ne s'enflamment pas, elles sont absorbées sur un papier-filtre qui est exposé à l'air, à température ambiante (20 °C environ), pendant cinq minutes. Si la substance, solide ou liquide, enflamme ou carbonise un papier-filtre, elle est considérée comme pyrophorique.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

Répétabilité: en raison de l'importance que revêt l'aspect «sécurité», un seul résultat positif est suffisant pour conclure que la substance est très inflammable.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.6.1. **Appareillage**

Remplir une capsule de porcelaine de 10 cm de diamètre environ de terre d'infusoires, sur une épaisseur de 5 mm environ, à température ambiante (20 °C environ).

Remarque:

La terre d'infusoires, ou toute autre substance inerte comparable généralement disponible, sera prise comme représentative du sol sur lequel la substance pourra être accidentellement répandue.

Les essais concernant les liquides qui ne s'enflamment pas au contact de l'air lorsqu'ils sont en contact avec un porteur inerte seront effectués avec un papier-filtre sec.

▼B

1.6.2. **Réalisation de l'essai**

a) *Solides pulvérulents*

Verser 1 ou 2 cm^3 de substance pulvérulente à tester, d'une hauteur d'environ 1 m sur une surface non combustible et observer si la substance s'enflamme pendant la chute ou pendant les cinq premières minutes de tassement.

L'essai est répété six fois, à moins qu'une inflammation ne survienne.

b) *Liquides*

Verser environ 5 cm^3 de liquide à essayer dans une capsule de porcelaine préparée et observer si la substance s'enflamme dans les cinq minutes.

S'il ne survient pas d'inflammation au cours de six essais, effectuer l'essai suivant:

Déposer à l'aide d'une seringue 0,5 ml de l'échantillon à essayer sur un papier-filtre à cet usage et observer si le papier-filtre s'enflamme ou se carbonise dans les cinq minutes qui suivent le dépôt du liquide. L'essai est effectué trois fois, à moins qu'une inflammation ou une carbonisation ne survienne.

2. **DONNÉES**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

L'essai peut être interrompu dès que l'un des essais donne un résultat positif.

2.2. ÉVALUATION

Si la substance s'enflamme dans les cinq minutes après avoir été ajoutée à un porteur inerte et exposée à l'air, ou si un liquide carbonise ou enflamme un papier-filtre dans les cinq minutes après avoir été déposé sur ce dernier et exposé à l'air, il est considéré comme pyrophore.

3. **RÉSULTATS**

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

— les spécifications précises de la substance (identité et impuretés),

— les résultats de l'essai,

— toute observation supplémentaire pertinente pour l'interprétation des résultats.

4. **RÉFÉRENCES**

(1) NF T 20-039 (septembre 1985), Produits chimiques à usage industriel — Détermination de l'inflammabilité spontanée des solides et liquides.

(2) Recommandations relatives au transport des marchandises dangereuses — Épreuves et critères, 1990, Nations unies, New York.

▼B

A.14. DANGER D'EXPLOSION

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

Cette méthode permet de déterminer si une substance solide ou pâteuse présente un danger d'explosion lorsqu'elle est soumise à l'effet d'une flamme (sensibilité thermique), à un choc ou à une friction (sensibilité aux stimulations mécaniques), et si une substance liquide présente un danger d'explosion lorsqu'il est soumis à l'effet d'une flamme ou d'un choc.

La méthode comprend trois parties:

a) un essai de sensibilité thermique (1),

b) un essai de sensibilité mécanique (choc) (1),

c) un essai de sensibilité mécanique (friction) (1).

La méthode fournit des données permettant d'évaluer la probabilité d'amorcer une explosion par certaines stimulations ordinaires. Elle n'a pas pour objet d'affirmer qu'une substance n'est pas susceptible d'exploser dans certaines conditions.

La méthode est apte à déterminer si une substance présentera un danger d'explosion (sensibilité thermique et mécanique) dans les conditions particulières définies par la directive. Elle repose sur un certain nombre de types d'appareils qui sont largement utilisés sur le plan international (1) et qui donnent en règle générale des résultats probants. Il est cependant admis qu'elle n'a pas une valeur définitive. D'autres appareils que ceux qui sont mentionnés peuvent être utilisés, à condition qu'ils soient reconnus à l'échelle internationale et que les résultats puissent être mis en corrélation avec les résultats obtenus avec les appareils spécifiés.

Il n'est pas nécessaire d'effectuer les essais lorsque les informations disponibles, d'ordre thermodynamique (par exemple: chaleur de formation, chaleur de décomposition) ou structural (absence de certains groupes réactifs (2) dans la formule développée), montrent que la substance n'est, sans aucun doute, pas susceptible de se décomposer rapidement en libérant des gaz ou de la chaleur (à savoir, que ce matériau ne présente aucun risque d'explosion). Il est inutile de réaliser un essai de sensibilité mécanique à la friction pour les liquides.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Substances explosibles:

substances qui sont susceptibles d'exploser sous l'effet d'une flamme, ou qui sont sensibles au choc ou à la friction dans l'appareil spécifié (ou dont la sensibilité mécanique est supérieure à celle du 1,3-dinitrobenzène dans un autre appareil).

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

1,3-dinitrobenzène, produit technique cristallisé, tamisé (qui passe au travers d'une maille de 0,5 mm) pour la méthode d'essai par friction et par choc.

Perhydro-l,3,5,-trinitro-l,3,5-triazine (RDX, hexogène, cyclonite — CAS 121-82-4), recristallisé à partir d'une solution aqueuse de cyclohexanone, tamisé mouillé au travers d'une maille de 250 μm et retenu par une maille de 150 μm) puis séché à 103 ± 2 °C (pendant 4 heures) pour la seconde série d'essais par friction et par choc.

▼B

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Des essais préliminaires sont nécessaires pour établir les conditions de sécurité devant présider à l'exécution des trois essais de sensibilité.

1.4.1. **Essais de sécurité de manipulation (3)**

Pour des raisons de sécurité, avant d'effectuer les essais proprement dits, des échantillons très réduits (10 mg environ) de substance sont soumis à échauffement sans confinement dans la flamme d'un brûleur à gaz, à un choc dans toute forme appropriée d'appareil, et à friction en utilisant un maillet et une enclume ou tout autre type de dispositif à friction. Ces essais ont pour objectif de déterminer si la substance est sensible et explosible au point de devoir s'entourer de précautions particulières pour réaliser les essais de sensibilité prescrits, notamment les essais de sensibilité thermique, afin d'éviter tout dommage corporel pour l'expérimentateur.

1.4.2. **Sensibilité thermique**

Cette méthode consiste à chauffer la substance dans un tube d'acier, fermé par des plaques à orifice dont le trou peut avoir différents diamètres, pour déterminer si la substance ou la préparation est susceptible d'exploser dans des conditions de température très élevée et de confinement défini.

1.4.3. **Sensibilité mécanique (choc)**

Cette méthode consiste à soumettre la substance au choc d'une masse spécifiée tombant d'une hauteur définie.

1.4.4. **Sensibilité mécanique (friction)**

La méthode consiste à soumettre des substances solides ou pâteuses à une friction entre des surfaces standard dans des conditions spécifiées de charge et de mouvement relatif.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

Non indiqués.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Sensibilité thermique (effet d'une flamme)**

1.6.1.1. *Appareil*

L'appareil consiste en un tube d'acier non réutilisable et de son système de fermeture réutilisable (figure 1), installé dans un dispositif de chauffage et de protection. Chaque tube, d'un diamètre interne de 24 mm, d'une longueur de 75 mm et d'une épaisseur de paroi de 0,5 mm, est réalisé par un processus d'emboutissage profond à partir d'une tôle (voir appendice). Les tubes sont pourvus d'une bride de fermeture à leur extrémité ouverte afin de pouvoir les fermer par une plaque à orifice. Il s'agit d'une plaque solidement assujettie au tube par un joint fileté en deux parties (écrou et écrou borgne), résistante à la pression et munie d'un orifice central. L'écrou et l'écrou borgne sont en acier au chrome-manganèse (voir annexe) ne produisant aucune étincelle jusqu'à 800 ^{o}C. Les plaques ont une épaisseur de 6 mm et sont fabriquées avec un acier résistant à la chaleur (voir annexe). L'expérimentateur dispose d'une série de plaques dont l'orifice présente différents diamètres.

▼B

1.6.1.2. *Conditions de l'essai*

L'essai est normalement réalisé avec la substance telle qu'elle est reçue; toutefois, dans certains cas, par exemple si elle est comprimée, coulée ou condensée d'une manière quelconque, il peut être nécessaire de la désagréger avant de procéder à l'essai.

Pour les solides, la masse de matériel à utiliser pour chaque essai est déterminée par une opération préliminaire à deux étapes. Placer un volume de substance de 9 cm^3 dans un tube taré, puis tasser en appliquant une force de 80 N sur toute la surface de la section du tube. D'autres méthodes de remplissage doivent parfois être utilisées pour des raisons de sécurité ou lorsque l'état physique de l'échantillon peut être modifié par la compression; par exemple, si la substance est très sensible à la friction, il ne faut pas tasser. Si le matériel est compressible, en rajouter et tasser jusqu'à ce que le tube soit rempli jusqu'à 55 mm du bord. Déterminer la masse totale utilisée pour remplir le tube jusqu'à ce niveau, puis ajouter de la substance encore deux fois, en tassant à chaque fois avec une force de 80 N. Ensuite, rajouter du matériel et tasser, ou en enlever, de manière à ce que le tube soit rempli jusqu'à 15 mm du bord. Effectuer une seconde opération préliminaire en commençant avec une quantité tassée correspondant au tiers de la masse totale déterminée lors de l'opération précédente. Ajouter deux fois de la substance en tassant avec une force de 80 N et ajuster le niveau à 15 mm du bord du tube en ajoutant du matériel ou en enlevant. La quantité de produit solide déterminée lors de cette seconde opération est utilisée pour chaque essai; le remplissage est effectué en trois fois avec des quantités égales de substance comprimées afin que leur volume soit de 9 cm^3, quelle que soit la force nécessaire pour y parvenir. (Cette opération peut être facilitée par l'emploi d'anneaux d'espacement.)

Les liquides et les gels sont versés dans le tube jusqu'à une hauteur de 60 mm, en prenant soin d'éviter la formation de bulles d'air avec les gels. L'écrou borgne est glissé sur le tube par le bas, la plaque à orifice appropriée est insérée et l'écrou est serré après qu'a été appliqué un lubrifiant à base de bisulfite de molybdène. Il est important de vérifier qu'aucune substance n'est emprisonnée entre la bride et la plaque, ni dans les filetages.

Le chauffage est assuré par du propane venant d'une bouteille industrielle, équipée d'un régulateur de pression (60 à 70 mbar), grâce à un débitmètre, et distribué régulièrement (ce que l'on vérifie en observant les flammes des brûleurs) par un collecteur à quatre brûleurs. Les brûleurs sont situés autour de la chambre d'essai, comme indiqué à la figure 1. Les quatre brûleurs consomment ensemble 3,2 litres de propane par minute, environ. Il est possible d'utiliser d'autres gaz de chauffage et d'autres brûleurs, mais la vitesse de chauffage doit correspondre à celle qui est spécifiée à la figure 3. Pour tous les appareils, la vitesse de chauffage doit être vérifiée régulièrement en utilisant des tubes remplis de phtalate de dibutyle, comme indiqué à la figure 3.

1.6.1.3. *Déroulement des essais*

Chaque essai est poursuivi jusqu'à ce que le tube se soit fragmenté ou que le tube ait été chauffé pendant cinq minutes. Un essai aboutissant à la fragmentation du tube en trois parties, ou plus, qui peuvent parfois être reliées l'une à l'autre par d'étroites bandes de métal, comme l'illustre la figure 2, est considéré comme produisant une explosion. Un essai aboutissant à un plus petit nombre de fragments ou à une absence de fragmentation, est considéré comme ne produisant pas d'explosion.

▼B

Une série de trois essais est d'abord effectuée avec une plaque dont l'orifice a un diamètre de 6,0 mm et, si aucune explosion ne se produit, une seconde série de trois essais est réalisée avec une plaque dont l'orifice a un diamètre de 2,0 mm. S'il se produit une explosion au cours de l'une des séries d'essais, aucun essai supplémentaire n'est requis.

1.6.1.4. *Évaluation*

Le résultat de l'essai est considéré comme positif s'il se produit une explosion au cours de l'une des séries d'essais mentionnées ci-avant.

1.6.2. **Sensibilité mécanique (choc)**

1.6.2.1. *Appareil (figure 4)*

Le mouton de choc classique comprend essentiellement: un bloc de fonte avec une embase, une enclume, une colonne, des guides, des masses tombantes, un mécanisme de libération et un support pour l'échantillon. L'enclume d'acier (100 mm de diamètre × 70 mm de hauteur) est vissée sur un bloc d'acier (230 mm de longueur × 250 mm de largeur × 200 mm de hauteur) avec une embase coulée (450 mm de longueur × 450 mm de largeur × 60 mm de hauteur). Une colonne, qui consiste en un tube d'acier étiré sans soudure, est fixée dans un support vissé au dos du bloc d'acier. Quatre vis ancrent l'appareil dans un bloc de béton (60 × 60 × 60 cm) de telle sorte que les rails soient absolument verticaux et que la chute de la masse tombante ne soit pas entravée. L'expérimentateur dispose de masses de 5 et 10 kg, en acier trempé et dont la surface d'impact, d'un diamètre minimal de 25 mm, est en acier traité HRC 60 à 63.

L'échantillon à essayer est enfermé dans une matrice de choc constituée de deux cylindres coaxiaux en acier trempé, placés l'un au dessus de l'autre dans un cylindre d'acier creux faisant office de bague de guidage. Les cylindres d'acier trempé doivent avoir un diamètre de 10 (- 0,003, - 0,005) mm et une hauteur de 10 mm, des surfaces polies, des arêtes arrondies (rayon de courbure 0,5 mm) et une dureté de HRC 58 à 65. Le cylindre creux doit avoir un diamètre extérieur de 16 mm, un alésage de 10 (+ 0,005, + 0,010) mm et une hauteur de 13 mm. La matrice de choc est placée sur une enclume intermédiaire (26 mm de diamètre et 26 mm de hauteur) en acier, centrée par une bague munie de perforations permettant aux vapeurs de s'échapper.

1.6.2.2. *Conditions de l'essai*

L'échantillon doit avoir un volume de 40 mm^3, ou un volume compatible avec l'appareil utilisé. Les substances solides doivent être essayées à l'état sec et préparées comme suit:

a) les substances pulvérulentes sont tamisées (maille de 0,5 mm); la fraction séparée par tamisage est entièrement utilisée pour l'essai;

b) les substances comprimées, coulées ou condensées sont désagrégées et tamisées; la fraction de 0,5 à 1 mm de diamètre séparée par tamisage est utilisée pour l'essai et doit être représentative de la substance originale.

Les substances sous forme de pâte doivent être essayées à l'état sec si c'est possible, ou, en tout cas, après avoir enlevé la plus grande quantité possible de diluant. Pour ce qui est des substances liquides, l'essai est réalisé avec un intervalle de 1 mm entre le cylindre d'acier du haut et celui du bas.

▼B

1.6.2.3. *Déroulement des essais*

On effectue une série de six essais en faisant tomber une masse de 10 kg d'une hauteur de 0,40 m (40 J). S'il se produit une explosion au cours des six essais effectués à 40 J, une autre série de six essais doit être effectuée en faisant tomber une masse de 5 kg d'une hauteur de 0,15 m (7,5 J). Dans d'autres appareils, l'échantillon est comparé avec la substance de référence choisie selon la procédure établie (technique du «up-and-down», etc.).

1.6.2.4. *Évaluation*

Le résultat de l'essai est considéré comme positif si une explosion (l'inflammation ou un bruit intense équivaut à une explosion) se produit au moins une fois au cours des six essais réalisés avec l'appareil de choc indiqué ou si l'échantillon est plus sensible que le 1,3-dinitrobenzène ou le RDX lors d'un autre essai par choc.

1.6.3. **Sensibilité mécanique (friction)**

1.6.3.1. *Appareil (figure 5)*

L'appareil consiste en une plaque de base en fonte sur laquelle est monté le dispositif de friction proprement dit comprenant un crayon fixe en porcelaine et une plaquette mobile en porcelaine. La plaquette est fixée dans un coulisseau se déplaçant entre deux rails. Le coulisseau est relié par une barre d'entraînement et un engrenage de transmission excentrique à un moteur électrique, de telle sorte que la plaquette se déplace une fois seulement sur une distance de 10 mm, en arrière et en avant sous le crayon. Le crayon peut être chargé, par exemple, à 120 ou 360 newtons.

Les plaquettes de porcelaine plates sont en porcelaine blanche technique (rugosité de 9 à 32 μm) et ont les dimensions suivantes: 25 mm de longueur, 25 mm de largeur et 5 mm de hauteur. Le crayon cylindrique qui est également en porcelaine blanche technique (longueur 15 mm, diamètre 10 mm), présente des extrémités sphériques rugueuses dont le rayon de courbure est de 10 mm.

1.6.3.2. *Conditions de l'essai*

L'échantillon doit avoir un volume de 10 mm^3, ou un volume compatible avec l'appareil utilisé.

Les substances solides sont essayées à l'état sec et préparées comme suit:

a) les substances pulvérulentes sont tamisées (maille de 0,5 mm); la fraction séparée par tamisage est entièrement utilisée pour l'essai;

b) les substances comprimées, coulées ou condensées sont désagrégées et tamisées; la fraction tamisée d'un diamètre inférieur à 0,5 mm est utilisée pour l'essai.

Les substances sous forme de pâte doivent être essayées à l'état sec si possible. Si la substance ne peut pas être préparée à l'état sec, la pâte (après avoir enlevé la plus grande quantité possible de diluent) est essayée sous la forme d'un film de 0,5 mm d'épaisseur, 2 mm de largeur et 10 mm de longueur préparé à l'aide d'un gabarit.

▼B

1.6.3.3. *Déroulement des essais*

Placer le crayon de porcelaine sur l'échantillon soumis à essai et accrocher le poids. Lors de la réalisation de l'essai, les marques laissées par l'éponge sur la plaquette de porcelaine doivent être transversales par rapport à la direction du mouvement. Veiller à ce que le crayon repose sur l'échantillon, à ce que la quantité de substance essayée soit suffisante et à ce que la plaquette se déplace correctement sous le crayon. Les substances pâteuses seront appliquées sur le plateau à l'aide d'une gabarit de 0,5 mm d'épaisseur avec une rainure de 2 × 10 mm. La plaquette de porcelaine accomplit sous le crayon un mouvement de va-et-vient sur une distance de 10 mm dans chaque direction en 0,44 secondes. N'utiliser chaque partie de la surface de la plaquette et du crayon que pour un seul essai; les deux extrémités de chaque crayon serviront pour deux essais et les deux surfaces de la plaquette pour trois essais.

Une série de six essais est effectuée avec une charge de 360 N. Si un résultat positif survient au cours de ces six essais, il convient d'effectuer une autre série de six essais avec une charge de 120 N. Dans d'autres appareils, l'échantillon est comparé avec la substance de référence choisie en suivant un mode opératoire établi (technique «up-and-down», etc.).

1.6.3.4. *Évaluation*

Le résultat de l'essai est considéré comme positif s'il se produit au moins une explosion (un crépitement, un bruit intense ou une inflammation sont équivalents à une explosion) au cours de l'un des essais réalisés avec l'appareil de friction indiqué ou s'il satisfait aux critères équivalents pour un autre essai de friction.

2. **DONNÉES**

En principe, une substance est considérée comme présentant un risque d'explosion dans le sens de la directive dés qu'un résultat est positif lors des essais de sensibilité thermique, au choc ou à la friction.

3. **RÉSULTATS**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

— l'identité, la composition, la pureté, le contenu en humidité, etc., de la substance soumise à essai,

— la forme physique de l'échantillon; préciser s'il a été désagrégé, cassé ou tamisé,

— les observations relevées au cours des essais de sensibilité thermique (par exemple masse de l'échantillon, nombre de fragments, etc.),

— les observations relevées au cours des essais de sensibilité mécanique (par exemple formation d'une quantité considérable de fumée ou décomposition complète sans bruit intense, flammes, étincelles, crépitation, etc.),

— les résultats de chaque type d'essai,

— si un autre appareil a été utilisé, fournir une justification scientifique ainsi que la preuve de la corrélation entre les résultats obtenus avec l'appareil spécifié et les résultats obtenus avec l'appareil utilisé,

▼B

— tout commentaire utile, se référant notamment aux essais pratiqués avec des produits similaires, susceptible d'être pertinent pour une interprétation correcte des résultats,

— toutes observations supplémentaires pertinentes pour l'interprétation des résultats.

3.2. INTERPRÉTATION ET ÉVALUATION DES RÉSULTATS

Le rapport d'essai doit mentionner tous les résultats considérés comme erronés, anormaux, ou non représentatifs. Lorsqu'un des résultats est rejeté, fournir une explication et indiquer les résultats de tout essai substitutif ou supplémentaire. À moins de pouvoir expliquer un résultat anormal, celui-ci doit être accepté tel quel et utilisé pour classer la substance en conséquence.

4. **RÉFÉRENCES**

(1) Recommandations relatives au transport des marchandises dangereuses, Épreuves et critères, 1990, Nations unies, New York.

(2) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, London, ISBN 0-750-60103-5, 1990.

(3) Koenen, H., Ide, K.H. und Swart, K.H. Explosive Stoffe, 1961, vol.3, 6-13 and 30-42.

(4) NFT 20-038 (septembre 1985). Produits chimiques à usage industriel — Détermination du danger d'explosion.

▼B

Annexe

Exemple de spécification de matériel pour les essais de sensibilité thermique (voir norme DIN 1623)

(1) Tube: Spécification de matériel N° 1.0336.505 g

(2) Plaque à orifice: Spécification de matériel N° 1.4873

(3) Écrou et écrou borgne: Spécification de matériel N° 1.3817

Figure 1

Appareil d'essai de sensibilité thermique

(dimensions en mm)

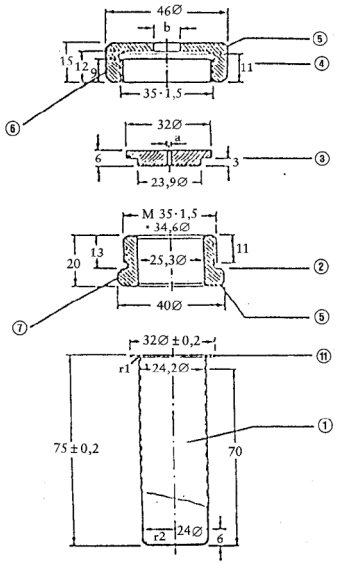


Fig. 1a Tube d'acier et accessoires

(1) tube
(1a) bride extérieure
(2) collier fileté; filetage à faible friction
(3) plaque à orifice a = 2,0 ou 6,0 mm de diamètre
(4) écrou b = 10 mm de diamètre
(5) chanfrein
(6) 2 pans pour clé de 41

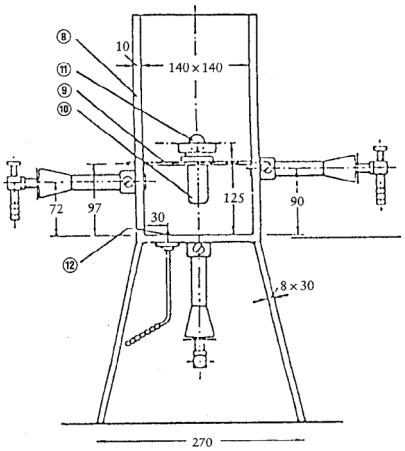


Fig. 1b Dispositifs de chauffage et de protection

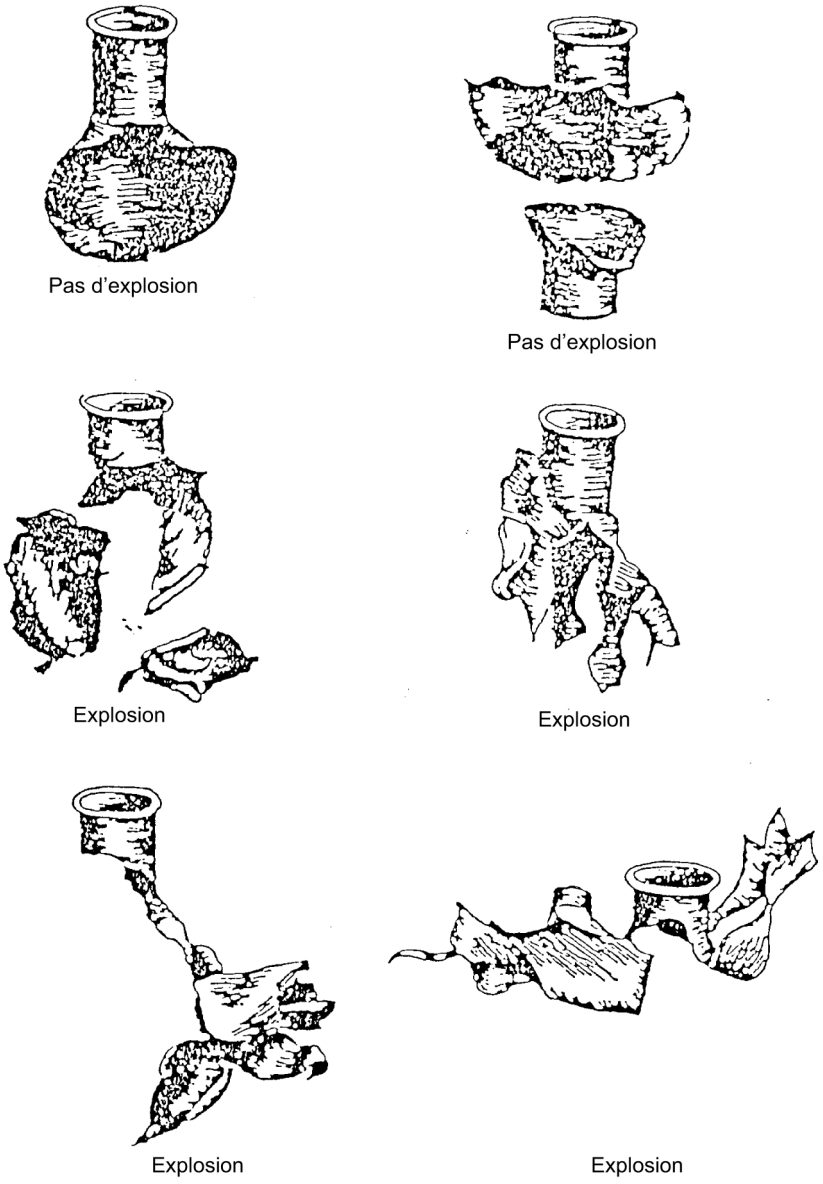
(7) 2 pans pour clé de 36
(8) enceinte résistante aux éclats
(9) 2 barres de support pour le tube
(10) tube assemblé
(11) position du brûleur arrière ; les autres brûleurs sont visibles
(12) veilleuse

▼B

Figure 2

Essai de sensibilité thermique

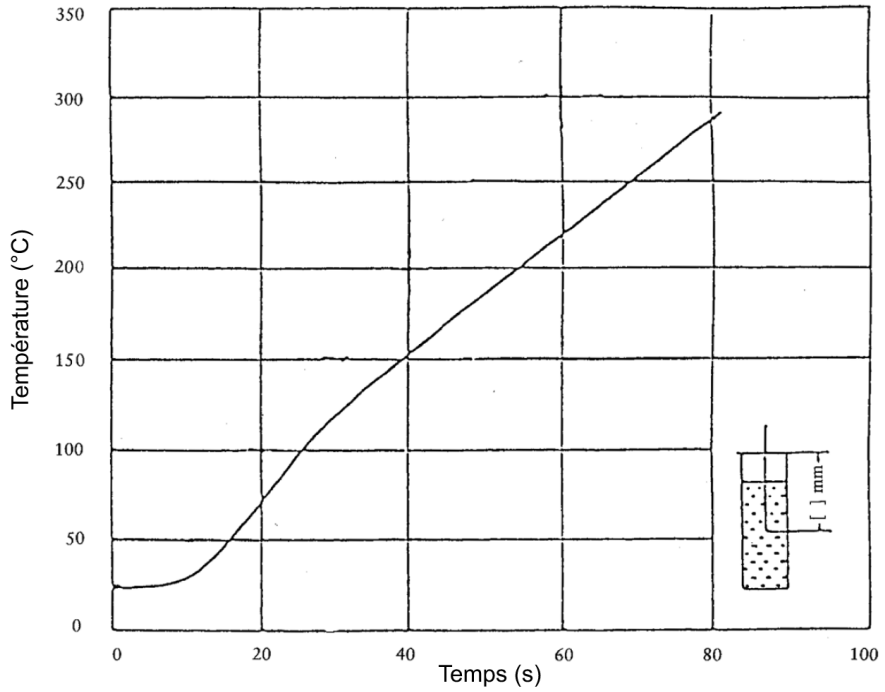
Exemples de fragmentation



▼B

Figure 3

Étalonnage de la vitesse d'échauffement pour essai de sensibilité thermique TEMPS (s)



Courbe de température en fonction du temps obtenue en chauffant du phtalate de dibutyle (27 cm^3) dans un tube fermé (plaque à orifice de 1,5 mm) au moyen d'un débit de propane de 3,2 litres/minute. La température est mesurée à l'aide d'un thermocouple chromel/alumel gainé d'acier inoxydable de 1 mm de diamètre, placé en position centrale, 43 mm sous le bord du tube. Entre 135 °C et 285 °C, la vitesse d'échauffement doit se situer entre 185 et 215 K/minute.

▼B

Figure 4

Appareil d'essai de sensibilité au choc

(dimensions en mm)

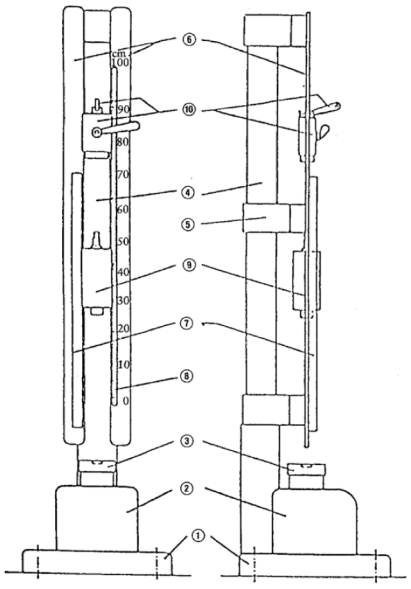


Fig. 4a Appareil à mouton, vue générale de face et latérale

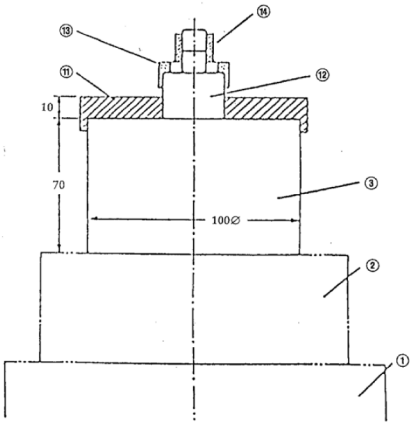


Fig. 4b Appareil à mouton partie inférieure

(1) embase 450 x 450 x 60
(2) bloc d'acier 230 x 250 x 200
(3) enclume 100 (diamètre) x 70
(4) colonne
(5) partie médiane transversale
(6) 2 rails
(7) crémaillère
(8) échelle graduée
(9) mouton (masse qui tombe)
(10) dispositif de support et de libération
(11) plaque de positionnement
(12) enclume intermédiaire 26 (diamètre) x 26
(13) bague de positionnement munie d'orifices
(14) dispositif d'impact

▼B

Figure 4

suite

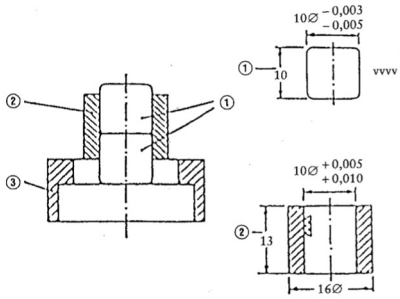


Fig. 4c Dispositif de choc pour les substances sous forme de poudres ou de pâtes

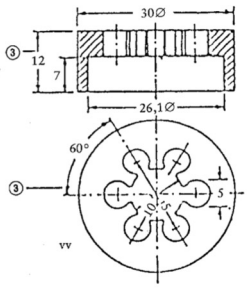
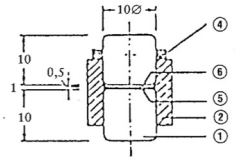


Fig. 4d Dispositif de choc pour les substances liquides

(1) cylindres d'acier
(2) anneau de guidage pour les cylindres d'acier
(3) bague de positionnement munie d'orifices
(a) section verticale
(b) plan
(4) anneau de caoutchouc
(5) substance liquide (40 mm^3)
(6) espace sans liquide



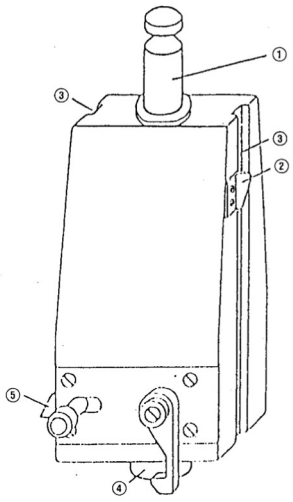


Fig. 4e Mouton (masse de 5 kg)

(1) ergot de suspension
(2) marqueur de hauteur
(3) sillon de positionnement
(4) tête d'impact cylindrique
(5) arrêt de rebond

▼B

Figure 5

Appareil d'essai de sensibilité à la friction

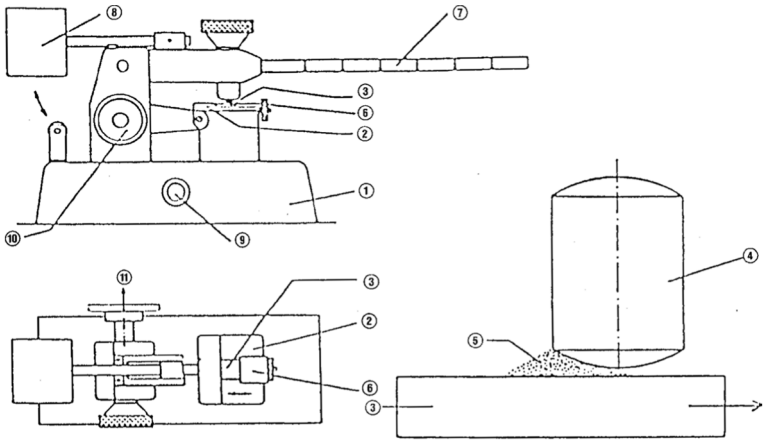


Fig. 5a Appareil de friction : vue de dessus et plane

(1) Embase d'acier
(2) Coulisseau mobile
(3) Plaquette de porcelaine 25 x 25 x 5 mm maintenue sur le coulisseau
(4) Crayon de porcelaine fixe 10 mm (diamètre) x 15 mm
(5) échantillon à essayer (10 mm^3 environ)

Fig. 5b Position de départ du crayon sur l'échantillon

(6) Support de crayon
(7) Bras de charge
(8) Contrepoids
(9) Interrupteur
(10) Roue permettant d'amener le coulisseau en position de départ
(11) Vers un moteur électrique

▼B

A.15. TEMPÉRATURE D'INFLAMMATION SPONTANÉE DES LIQUIDES ET DES GAZ

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

Les substances explosives qui s'enflamment spontanément au contact de l'air à température ambiante ne doivent pas être soumises à cet essai. Le mode opératoire est applicable aux gaz, aux liquides et aux vapeurs qui peuvent être enflammés par une surface chaude, en présence d'air.

La température d'inflammation spontanée peut être réduite considérablement par la présence d'impuretés catalytiques, par la matière de la surface ou par une augmentation du volume du récipient d'essai.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Le degré d'inflammabilité spontanée est exprimé en termes de température d'inflammation spontanée. La température d'inflammation spontanée est la température la plus basse à laquelle s'enflamme la substance à essayer mélangée avec de l'air dans les conditions définies dans la méthode d'essai.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Les substances de références sont citées dans les normes (voir 1.6.3). Elles devraient servir en premier lieu à vérifier de temps à autre la fiabilité de la méthode et à permettre de comparer les résultats obtenus avec différentes méthodes.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La méthode permet de déterminer la température minimale de la surface interne d'une enceinte qui provoquera l'inflammation d'un gaz, d'une vapeur ou d'un liquide injecté dans l'enceinte.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

La répétabilité varie en fonction de l'intervalle de température d'inflammation spontanée et de la méthode d'essai utilisée.

La sensibilité et la spécificité dépendent de la méthode d'essai utilisée.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Appareil**

L'appareil est décrit dans la méthode évoquée au point 1.6.3.

1.6.2. **Conditions de l'essai**

Un échantillon de la substance à essayer est essayé selon le point 1.6.3.

1.6.3. **Mode opératoire**

Voir normes IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056, NF T 20-037.

▼B

2. **DONNÉES**

Noter la température d'essai, la pression atmosphérique, la quantité d'échantillon utilisée et le laps de temps qui s'écoule avant que l'inflammation se produise.

3. **RÉSULTATS**

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

— les spécifications précises de la substance (identité et impuretés),

— la quantité d'échantillon utilisée, la pression atmosphérique,

— l'appareil utilisé,

— les résultats des mesures (température d'essai, résultats concernant l'inflammation, laps de temps correspondants),

— toute observation supplémentaire pertinente pour l'interprétation des résultats.

4. **RÉFÉRENCES**

Aucune.

▼B

A.16. **TEMPÉRATURE RELATIVE D'INFLAMMATION SPONTANÉE POUR LES SOLIDES**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Les substances explosibles et les substances qui s'enflamment spontanément au contact de l'air à température ambiante ne doivent pas être soumises à cet essai.

L'objectif en est de fournir des données préliminaires sur l'inflammabilité spontanée des substances solides soumises à de hautes températures.

Si la chaleur engendrée, soit par une réaction de la substance avec l'oxygène, soit par décomposition exothermique, ne se dissipe pas assez rapidement dans l'environnement, l'auto-échauffement entraîne l'inflammation spontanée. L'inflammation spontanée se produit par conséquent lorsque la vitesse de production de chaleur excède la vitesse de perte de chaleur.

Le procédé d'essai est utile en tant que test préliminaire de sélection des substances solides. Compte tenu de la nature complexe de l'inflammation et de la combustion des solides, la température d'inflammation spontanée déterminée selon cette méthode d'essai ne doit servir qu'à des fins de comparaison.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

La température d'inflammation spontanée telle qu'elle est déterminée par cette méthode est la température ambiante minimale exprimée en degrés Celsius (^{o}C), à laquelle un certain volume d'une substance s'enflamme spontanément dans des conditions définies.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Placer un volume défini de la substance soumise à essai dans un four à température ambiante; enregistrer la courbe température/temps au centre de l'échantillon, la température du four étant portée à 400 ^{o}C, ou à la température du point de fusion si celle-ci est inférieure, à la vitesse de 0,5 ^{o}C/mn. Pour les besoins de cet essai, la température du four à laquelle l'échantillon atteint une température de 400 ^{o}C par auto-échauffement est appelée température d'inflammation spontanée.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

Aucun.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Appareil**

1.6.1.1. *Four*

Un four de laboratoire à température programmable (d'un volume de 2 litres environ) équipé d'une circulation d'air naturel et d'un clapet d'explosion. Pour éviter tout risque potentiel d'explosion, il convient d'empêcher que les gaz de décomposition puissent entrer en contact avec les éléments de chauffage électrique.

▼B

1.6.1.2. *Cube en treillis de fil métallique*

Couper un morceau de treillis en fil d'acier inoxydable d'une maille d'une taille de 0,045 mm, selon le modèle indiqué à la figure 1. Plier le treillis et l'attacher avec du fil métallique en forme de cube ouvert.

1.6.1.3. *Thermocouples*

Thermocouples appropriés.

1.6.1.4. *Enregistreur*

Tout enregistreur à deux canaux, étalonné à l'intervalle 0 — 600 °C ou à une tension correspondante.

1.6.2. **Conditions de l'essai**

Les substances sont testées telles qu'elles sont reçues.

1.6.3. **Mode opératoire**

Remplir le cube de la substance soumise à essai. Tasser doucement en ajoutant de la substance jusqu'à le remplir complètement. Suspendre ensuite le cube au centre du four à température ambiante. Placer un thermocouple au centre du cube et l'autre entre le cube et la paroi du four afin d'enregistrer la température du four.

Les températures du four et de l'échantillon sont enregistrées en continu pendant que la température du four est portée à 400 °C, ou au point de fusion si cette valeur est plus basse, à une vitesse de 0,5 °C/min.

Lorsque la substance s'enflamme, le thermocouple de l'échantillon indiquera une très forte montée de température par rapport à la température du four.

2. **DONNÉES**

La température du four à laquelle la température de l'échantillon atteint 400 °C par auto-échauffement est pertinente pour l'évaluation (voir figure 2).

3. **RÉSULTATS**

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

— une description de la substance à essayer,

— les résultats des mesures incluant la courbe température/temps,

— toute observation supplémentaire pertinente pour l'interprétation des résultats.

4. **RÉFÉRENCES**

(1) NF T 20-036 (septembre 1985). Produits chimiques à usage industriel — Détermination de la température relative d'inflammation spontanée des solides.

▼B

Figure 1

Modèle de cube d'essai de 20 mm

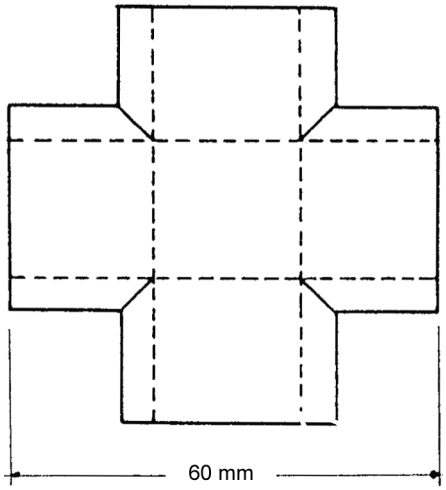
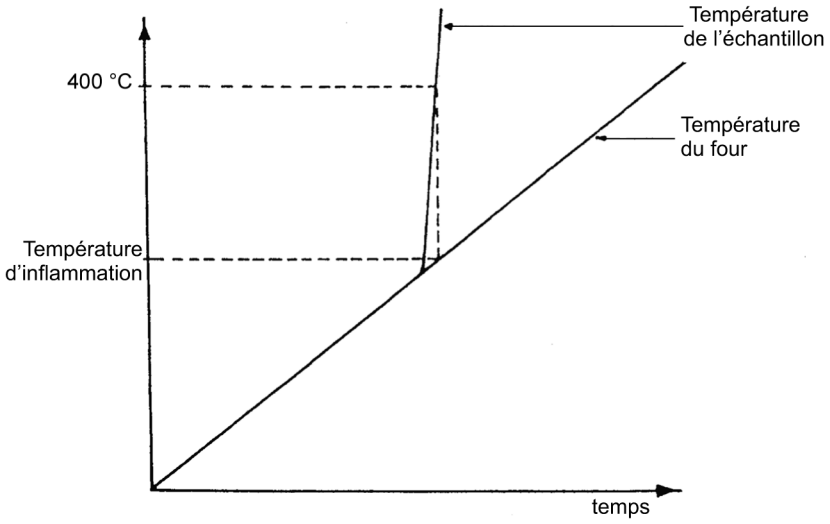


Figure 2

Courbe type température/temps



▼B

A.17. PROPRIÉTÉS COMBURANTES (SOLIDES)

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

Il est utile de disposer d'informations préliminaires sur les propriétés explosives éventuelles de la substance avant d'effectuer cet essai.

Cet essai n'est pas applicable aux liquides, aux gaz, aux substances explosives ou très inflammables ou aux peroxydes organiques.

Cet essai est inadapté quand l'examen de la structure chimique montre que la substance ne peut sans aucun doute avoir de réaction de type exothermique avec un combustible.

Un essai préliminaire doit être effectué pour s'assurer que cet essai ne nécessite pas de précautions particulières.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Temps de combustion: temps de réaction, exprimé en secondes, pris par la zone de réaction pour se propager à travers un tas, selon la procédure décrite au point 1.6.

Vitesse de combustion: exprimée en millimètres par seconde.

Vitesse maximale de combustion: valeur la plus élevée parmi les vitesses de combustion obtenues avec des mélanges contenant 10 à 90 % en poids de comburant.

1.3. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Le nitrate de barium (de pureté analytique) est utilisé comme substance de référence pour l'essai et l'essai préliminaire.

Le mélange de référence est composé de nitrate de barium et de cellulose en poudre, préparé conformément au point 1.6 et possédant la vitesse de combustion maximale (il s'agit généralement d'un mélange contenant 60 % de nitrate de barium en poids).

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Il convient, pour des raisons de sécurité, d'effectuer un essai préliminaire. Il est inutile de continuer l'essai si l'essai préliminaire montre clairement que la substance a des propriétés oxydantes. Lorsque ce n'est pas le cas, la substance est soumise à l'essai complet.

Dans l'essai complet, la substance à essayer et une substance combustible définie sont mélangées dans des proportions variables. Chacun de ces mélanges est alors disposé en tas, que l'on enflamme à une extrémité. La vitesse maximale de combustion est comparée à la vitesse maximale de combustion du mélange de référence.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

Lorsqu'elle est requise, toute méthode de broyage et de mélange est valable pour autant que l'écart entre la vitesse maximale de combustion et la moyenne arithmétique, dans les six essais, ne dépasse pas 10 %.

▼B

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Préparation**

1.6.1.1. *Substance à essayer*

L'échantillon à essayer est traité comme suit afin d'obtenir une granulométrie inférieure à 0,125 mm: tamiser la substance à essayer et broyer la fraction restante; répéter cette opération jusqu'à ce que tout l'échantillon soit passé au travers du tamis.

Toutes méthodes de broyage et de tamisage respectant les critères de qualité requis peuvent être utilisées.

Avant de préparer le mélange, sécher la substance à 105 °C jusqu'à obtention d'un poids constant. Si la température de décomposition de la substance est inférieure à 105 °C, la substance doit être séchée à une température moins élevée.

1.6.1.2. *Substance combustible*

On utilise de la cellulose en poudre comme substance combustible. Elle doit être du type utilisé en chromatographie en couche mince ou en colonne. Un type de cellulose dont la longueur de plus de 85 % des fibres est comprise entre 0,020 mm et 0,075 mm s'est avérée adéquate. La poudre de cellulose est tamisée au moyen d'un tamis à mailles de 0,125 mm. Il faut utiliser le même lot de cellulose pour tout l'essai.

Avant de préparer le mélange, sécher la poudre de cellulose à 105 °C jusqu'à ce que son poids soit constant.

Si de la sciure de bois est utilisée lors de l'essai préliminaire, préparer une sciure de bois tendre qui passe au travers d'un tamis d'une maille de 1,6 mm, mélanger, puis sécher à 105 °C pendant 4 heures en couche de moins de 25 mm d'épaisseur. Refroidir la sciure et la conserver jusqu'à utilisation dans un récipient hermétique aussi rempli que possible. Elle sera de préférence utilisée dans les 24 heures après séchage.

1.6.1.3. *Source d'allumage*

Utiliser la flamme d'un brûleur à gaz (diamètre; 5 mm minimum). Si une autre source d'allumage est utilisée (par exemple lorsque l'essai est effectué dans une atmosphère inerte), fournir la description et la justification.

1.6.2. **Mode opératoire**

Note:

Les mélanges de comburants avec de la cellulose ou de la sciure de bois doivent être considérés comme des explosifs potentiels et manipulés avec prudence.

1.6.2.1. *Essai préliminaire*

La substance séchée est grossièrement mélangée à de la cellulose ou à de la sciure de bois sèche dans des proportions de 2 (substance à essayer) pour 1 (cellulose ou sciure de bois) en poids et le mélange est disposé en petit tas conique de 3,5 cm (diamètre de base) × 2,5 cm (hauteur) par remplissage sans tassement d'une forme conique (par exemple un entonnoir de laboratoire en verre dont le tube est bouché).

▼B

Le tas est placé sur une plaque froide, non-combustible, non poreuse, et peu thermo-conductrice. L'essai doit être conduit dans une hotte aspirante (voir point 1.6.2.2).

La source d'allumage est mise en contact avec le cône. L'intensité et la durée de la réaction sont observées et enregistrées.

La substance doit être considérée comme comburante si la réaction est intense.

Lorsqu'il y a doute quant au résultat, il est nécessaire de pratiquer l'essai complet décrit ci-après.

1.6.2.2. *Essai complet*

Préparer des mélanges oxydant/cellulose contenant de 10 à 90 % de comburant, en poids, par incréments de 10 %. Pour les cas limites utiliser des mélanges comburant/cellulose intermédiaires pour déterminer la vitesse maximale de combustion avec plus de précision.

On réalise un tas au moyen d'un moule métallique d'une longueur de 250 mm et dont la section triangulaire transversale a une hauteur intérieure de 10 mm et une largeur intérieure de 20 mm. Placer comme cadres latéraux des deux côtés du moule, dans le sens de la longueur, deux plaques métalliques dépassant de 2 mm le bord supérieur de la section triangulaire (figure). Remplir ce dispositif avec un excès de mélange, sans tasser. Après avoir laissé tomber le moule une fois d'une hauteur de 2 cm sur une surface dure, racler l'excès avec une raclette tenue obliquement. Enlever alors les cadres latéraux et égaliser la surface de la poudre à l'aide d'un rouleau. Disposer une plaque non-combustible non-poreuse et peu thermo-conductrice sur le moule, retourner et démouler.

Disposer le tas dans une hotte perpendiculairement au sens de courant d'air.

Le débit d'air doit être suffisant pour empêcher les vapeurs de se répandre dans le laboratoire et il ne doit pas subir de modification au cours de l'essai. Le courant d'air doit former un écran entourant l'appareil.

Vu les propriétés hygroscopiques de la cellulose et de certaines substances à essayer, l'essai doit être effectué aussi rapidement que possible.

Enflammer une extrémité du tas par contact avec la flamme.

Mesurer le temps de réaction sur une distance de 200 mm après que la zone de réaction a parcouru une distance initiale de 30 mm.

L'essai est effectué avec la substance de référence et au moins une fois avec chacun des mélanges de substance à essayer et de cellulose.

Si l'on trouve une vitesse maximale de combustion significativement plus grande que celle de la substance de référence, l'essai peut être arrêté; autrement, les essais doivent être répétés cinq fois avec chacun des trois mélanges qui donnent les vitesses de combustion les plus élevées.

▼B

Si l'on soupçonne que le résultat est un «faux positif», répéter l'essai en remplaçant la cellulose par une substance inerte dont la taille des particules est la même, comme le *kieselguhr*. Une autre possibilité consiste à renouveler l'essai avec le mélange substance à essayer/cellulose dont la vitesse de combustion est la plus élevée, dans une atmosphère inerte (contenu d'oxygène < 2 % v/v).

2. **DONNÉES**

Pour des raisons de sécurité, la vitesse maximale de combustion — et non la valeur moyenne — sera retenue pour caractériser les propriétés comburantes de la substance examinée.

Pour l'évaluation d'un mélange donné, retenir la vitesse de combustion la plus élevée mesurée au cours des six essais.

Porter sur un graphique la vitesse de combustion la plus élevée de chaque mélange en fonction de la concentration de comburant. Déduire de ce graphique la vitesse de combustion maximale.

Les six vitesses de combustion mesurées au cours d'une même opération pour le mélange qui a donné la vitesse de combustion maximale ne doit pas s'écarter de plus de 10 % de la moyenne arithmétique; dans le cas contraire, il importe d'améliorer les méthodes de broyage et de mélange.

Comparer la vitesse maximale de combustion obtenue avec la vitesse maximale de combustion du mélange de référence (voir point 1.3).

Si les essais sont réalisés dans une atmosphère inerte, comparer la vitesse maximale avec la vitesse de réaction du mélange de référence dans une atmosphère inerte.

3. **RÉSULTATS**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

— l'identité, la composition, la pureté, le contenu en humidité etc., de la substance à essayer,

— tout traitement de l'échantillon à essayer (par exemple, broyage, séchage...),

— la source d'allumage utilisée dans les essais,

— les résultats des mesures,

— le type de réaction (par exemple combustion rapide superficielle, combustion à travers toute la masse, toute observation concernant les produits de combustion,...),

— toute observation supplémentaire, y compris une description de l'intensité (flamme, étincelle, fumée, lente incandescence, etc.) et la durée approximative de la réaction observée au cours de l'essai préliminaire de sécurité/dépistage pour la substance à essayer comme pour la substance de référence,

— les résultats des essais effectués avec un matériel inerte, s'il y a lieu,

— les résultats des essais effectués dans une atmosphère inerte, s'il y a lieu.

▼B

3.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Une substance est à considérer comme comburante si:

a) lors de l'essai préliminaire, il y a réaction intense;

b) lors de l'essai, la vitesse maximale de combustion de la substance soumise à essai est supérieure ou égale à celle du mélange de référence composé de cellulose et de nitrate de barium.

Pour éviter un «faux» résultat positif, il faut aussi tenir compte des résultats obtenus en essayant la substance mélangée avec un matériel inerte et/ou dans une atmosphère inerte, lors de l'interprétation des résultats.

4. **RÉFÉRENCES**

NF T 20-035 (septembre 1985). Produits chimiques à usage industriel — Détermination des propriétés comburantes des solides.

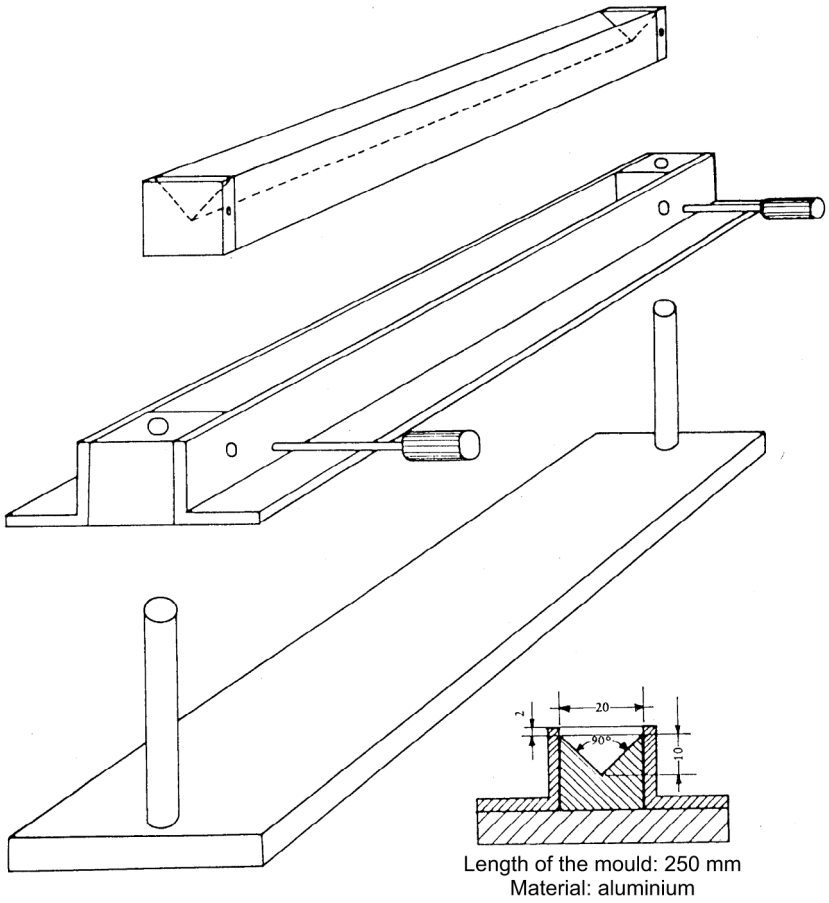
▼B

Annexe

Figure

Moule et accessoires nécessaires à la confection de tas

(toutes les dimensions sont en millimètres)



▼B

A.18. **DÉTERMINATION DE LA MASSE MOLÉCULAIRE MOYENNE EN NOMBRE ET DE LA DISTRIBUTION DES MASSES MOLÉCULAIRES DES POLYMÈRES**

1. **MÉTHODE**

Cette méthode de chromatographie sur gel perméable reprend la ligne directrice OCDE TG 118 (1996). Les principes fondamentaux et tous autres renseignements techniques sont donnés en référence (1).

1.1. INTRODUCTION

Les propriétés des polymères sont tellement diversifiées qu'il est impossible de décrire une méthode unique indiquant avec précision des conditions de séparation et d'évaluation qui recouvrent toutes les éventualités et particularités rencontrées dans la séparation des polymères. Les systèmes complexes de polymères, notamment, se prêtent rarement à la chromatographie sur gel perméable. Lorsque la chromatographie sur gel perméable n'est pas applicable, on peut déterminer la masse moléculaire moyenne à l'aide d'autres méthodes (voir annexe). Dans de tels cas, il convient de fournir tous les détails de la méthode utilisée et de justifier son choix.

La méthode décrite ci-après est basée sur la norme D1N 55672 (1). Celle-ci fournit des indications détaillées sur la manière de réaliser les expériences et d'évaluer les données. S'il est nécessaire de modifier les conditions expérimentales, ces changements doivent être justifiés. D'autres normes peuvent être utilisées, à condition d'en mentionner toutes les références. La méthode décrite fait appel à des échantillons de polystyrène de polydispersité connue pour l'étalonnage et il y aura peut-être lieu de la modifier pour l'adapter aux cas de polymères particuliers, par exemple, les polymères solubles dans l'eau et les polymères ramifiés à longue chaîne.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

La masse moléculaire moyenne en nombre M_n et la masse moléculaire moyenne en poids M_w sont déterminées à l'aide des équations suivantes:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

où

H_i est l'amplitude du signal du détecteur, par rapport au niveau de référence, correspondant au volume de rétention V_i;

M_i est la masse moléculaire de la fraction de polymère correspondant au volume de rétention V_i et

n est le nombre de points expérimentaux.

La largeur de la distribution des masses moléculaires, qui représente une mesure de la polydispersité du système, est donnée par le rapport M_w/M_n.

▼B

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

La méthode par chromatographie sur gel perméable étant une méthode relative, il est nécessaire de procéder à un étalonnage. Celui-ci est généralement effectué au moyen de polystyrènes étalons à chaîne linéaire et à distribution étroite, dont les masses moléculaires moyennes M_n et M_v ainsi que la distribution des masses moléculaires sont connues. La courbe d'étalonnage ne peut être utilisée pour déterminer la masse moléculaire d'un échantillon inconnu que si les conditions de séparation des échantillons et des étalons ont été sélectionnées de manière identique.

Une relation déterminée entre la masse moléculaire et le volume d'élution n'est valable que dans les conditions particulières d'une expérience donnée. Parmi ces conditions figurent, avant tout, la température, le solvant (ou le mélange de solvants), les conditions de chromatographie, ainsi que la colonne de séparation ou le système de colonnes.

Les masses moléculaires de l'échantillon déterminées de cette manière constituent des valeurs relatives et sont désignées par le terme «masses moléculaires en équivalent polystyrène». Cela signifie qu'en fonction des différences chimiques et structurelles entre l'échantillon à tester et les étalons, les masses moléculaires peuvent dévier des valeurs absolues de manière plus ou moins importante. Si d'autres étalons sont utilisés, par exemple le polyéthylène glycol, le poly(éthylène oxyde), le poly(méthacrylate de méthyle) ou l'acide polyacrylique, il importe d'en indiquer la raison.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La chromatographie sur gel perméable permet de déterminer la distribution des masses moléculaires ainsi que les masses moléculaires moyennes (M_n, M_w). La chromatographie sur gel perméable constitue un type particulier de chromatographie liquide dans lequel l'échantillon à tester est séparé en fonction des volumes hydrodynamiques de chaque constituant (2).

La séparation s'effectue à mesure que l'échantillon progresse dans une colonne remplie d'un matériau poreux, généralement un gel organique. Les petites molécules peuvent pénétrer dans les pores tandis que les grosses molécules en sont exclues. Le parcours des grosses molécules est, de ce fait, plus court; elles sont éluées en premier lieu. Les molécules de taille moyenne pénètrent dans certains des pores; elles sont éluées plus tard. Les molécules les plus petites, dont le rayon hydrodynamique moyen est plus petit que les pores du gel, peuvent pénétrer dans tous les pores. Elles sont éluées en dernier lieu.

Dans la situation idéale, c'est la taille des espèces moléculaires qui régit entièrement la séparation, mais, en pratique, il est difficile d'éviter tout au moins l'interférence de certains effets d'absorption. Un remplissage irrégulier de la colonne, de même que des volumes morts, peuvent aggraver la situation (2).

La détection s'effectue, par exemple, par mesure de l'indice de réfraction ou de l'absorption dans l'UV pour donner une courbe de distribution simple. Cependant, pour pouvoir associer à la courbe des valeurs de masses moléculaires réelles, il est nécessaire d'étalonner la colonne par passage de polymères de masse moléculaire connue et, idéalement, d'une structure aussi proche que possible, par exemple divers polystyrènes étalons. Une courbe de Gauss en résulte généralement, parfois avec une dissymétrie marquée du côté des faibles masses moléculaires, l'axe vertical indiquant la quantité, en poids, des espèces de différentes masses moléculaires éluées, tandis que sur l'axe horizontal figure le logarithme de la masse moléculaire.

▼B

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

La reproductibilité (écart-type relatif) du volume d'élution doit être au plus égale à 0,3 pour cent. Il y a lieu d'assurer la reproductibilité de l'analyse grâce à une correction mettant en jeu un étalon interne, si un chromatogramme est évalué en fonction du temps et ne satisfait pas aux critères mentionnés plus haut (1). Les polydispersités dépendent des masses moléculaires des étalons. Dans le cas des polystyrènes étalons, les valeurs typiques sont:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p est la masse moléculaire de l'étalon correspondant au maximum du pic)

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Préparation des solutions de polystyrène étalon**

On dissout les polystyrènes étalons en les mélangeant soigneusement à l'éluant choisi. On préparera les solutions en observant les recommandations du fabricant.

Les concentrations des étalons choisis dépendent de différents facteurs, comme le volume d'injection, la viscosité de la solution et la sensibilité du détecteur. Le volume d'injection maximum doit être adapté à la longueur de la colonne, en veillant à ne pas surcharger celle-ci. Les volumes d'injection courants pour des séparations analytiques par chromatographie sur gel perméable, au moyen d'une colonne de 30 cm × 7,8 mm, varient normalement entre 40 et 100 ml. Il est possible d'injecter des volumes plus importants, mais ceux-ci ne peuvent dépasser 250 µl. On doit déterminer le rapport optimal entre le volume d'injection et la concentration avant l'étalonnage de la colonne.

1.6.2. **Préparation de la solution de l'échantillon**

En principe, la préparation des solutions de l'échantillon s'effectue dans les mêmes conditions. L'échantillon est dissous dans un solvant approprié, par exemple le tétrahydrofurane (THF), en agitant soigneusement. Il ne doit, en aucun cas, être dissous dans un bain à ultrasons. Si nécessaire, la solution de l'échantillon est purifiée au moyen d'un filtre à membrane d'une dimension de pores comprise entre 0,2 et 2 µm.

La présence de particules non dissoutes doit être mentionnée dans le rapport final, dans la mesure où elle peut résulter d'espèces de masse moléculaire élevée. Il faut recourir à une méthode appropriée pour déterminer le pourcentage en poids des particules non dissoutes. Les solutions doivent être analysées dans un délai de 24 heures.

1.6.3. **Appareillage**

— un réservoir à solvant,

— un système de dégazage (si nécessaire),

— une pompe,

▼B

— un amortisseur d'impulsions (si nécessaire),

— un système d'injection,

— des colonnes de chromatographie,

— un détecteur,

— un débitmètre (si nécessaire),

— un système d'enregistrement et de traitement des données,

— un récipient pour recueillir les solutions usées.

On doit vérifier que le système de chromatographie sur gel perméable est inerte vis-à-vis des solvants utilisés (par exemple, utilisation de capillaires en acier lorsque le solvant est le THF).

1.6.4. **Injection et système de distribution du solvant**

Un volume défini de la solution de l'échantillon est chargé sur la colonne dans une zone étroitement définie, à l'aide d'un échantillonneur automatique ou manuellement. Si on opère manuellement, le fait de retirer ou d'enfoncer le piston de la seringue trop rapidement peut provoquer des modifications dans la distribution des masses moléculaires observées. Le système de distribution du solvant doit, dans la mesure du possible, être exempt de pulsations; il est souhaitable qu'il comporte un amortisseur d'impulsions. Le débit est de l'ordre de 1 ml/min.

1.6.5. **Colonne**

Selon la nature de l'échantillon a tester, le polymère est caractérisé en ayant recours à une seule colonne ou à plusieurs colonnes connectées en série. Un certain nombre de matériaux poreux pour colonne de propriétés définies (par exemple taille des pores, limites d'exclusion) sont disponibles dans le commerce. Le choix du gel de séparation ou celui de la longueur de la colonne dépendent, d'une part, des propriétés de l'échantillon à tester (volumes hydrodynamiques, distribution des masses moléculaires), d'autre part, des conditions particulières de la séparation, telles que la nature du solvant, la température et le débit (1) (2) (3).

1.6.6. **Plateaux théoriques**

La colonne ou la combinaison de colonnes utilisée pour la séparation doit être caractérisée par le nombre de plateaux théoriques. Pour ce faire, dans le cas où le solvant d'élution est le THF, il y a lieu de faire passer une solution d'ethylbenzène ou d'un autre soluté non polaire approprié sur une colonne de longueur connue. Le nombre de plateaux théoriques est donné par l'équation suivante:

$$N = 5{,}54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{ou} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

où:

N est le nombre de plateaux théoriques

V_e est le volume d'élution correspondant au maximum du pic

▼B

W est la largeur du pic au niveau de la ligne de base

$W_{1/2}$ est la largeur du pic à mi-hauteur.

1.6.7. **Efficacité de la séparation**

Outre le nombre de plateaux théoriques, paramètre déterminant la largeur de bande, l'efficacité de séparation est une autre grandeur caractéristique; c'est la pente de la courbe de calibrage qui la détermine. L'efficacité de séparation d'une colonne se détermine au moyen de la relation suivante:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{section de la colonne}} \geq 6{,}0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

où

$V_{e,\ M_x}$ est le volume d'élution du polystyrène de masse moléculaire M_x

$V_{e,(10.M_x)}$ est le volume d'élution du polystyrène de masse moléculaire 10 fois supérieure

La résolution du système est généralement définie comme suit:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

où,

V_{e1}, V_{e2} sont les volumes d'élution des deux polystyrènes étalons au maximum du pic

W_1, W_2 sont les largeurs des pics au niveau de la ligne de base

M_p M_2 sont les masses moléculaires correspondant au maximum des pics (elles devraient différer d'un facteur 10).

La valeur de R pour le système de colonnes doit être supérieure à 1,7 (4).

1.6.8. **Solvants**

Tous les solvants doivent être d'une grande pureté (on emploie du THF à 99,5 % de pureté). Le réservoir de solvant (mis, au besoin, sous atmosphère de gaz inerte) doit être assez grand pour permettre l'étalonnage de la colonne et plusieurs analyses d'échantillons. Le solvant sera dégazé avant d'être pompé vers la colonne.

1.6.9. **Régulation de la température**

La température des composants internes critiques (boucle d'injection, colonne(s), détecteur et tuyaux) doit être constante et compatible avec le choix du solvant.

▼B

1.6.10. **Détecteur**

Le détecteur sert à enregistrer de manière quantitative la concentration de l'échantillon qui est élue de la colonne. En vue d'éviter un élargissement indésirable des pics, le volume de la cuvette du détecteur sera choisi aussi petit que possible. Il ne doit pas excéder 10 µl, sauf pour les détecteurs par diffusion de la lumière et les viscosimètres. La détection s'effectue généralement par réfractométrie différentielle. Si les propriétés spécifiques de l'échantillon ou du solvant d'élution l'exigent, on peut toutefois utiliser d'autres types de détecteurs tels que les détecteurs UV/VIS ou IR, les viscosimètres, etc.

2. **RÉSULTATS ET PROCÈS-VERBAL D'ESSAI**

2.1. RÉSULTATS

On se référera à la norme DIN (1) pour ce qui concerne les critères d'évaluation détaillés, de même que pour les spécifications relatives à la collecte et au traitement des données.

Pour chaque échantillon analysé, il est nécessaire de réaliser deux expériences indépendantes. Leurs résultats seront analysés séparément.

Les paramètres M_n, M_w, M_w/M_n, M_p doivent être déterminés pour chaque mesure. Il est nécessaire d'indiquer de façon explicite que les valeurs mesurées sont des valeurs relatives correspondant a des équivalents de masse moléculaire de l'étalon utilisé.

Après avoir déterminé les volumes et les temps de rétention (éventuellement corrigés au moyen d'un étalon interne), on porte en graphique les valeurs de log M_p (M_p représentant les maxima des pics des polymères d'étalonnage) en fonction de l'une de ces quantités. Deux points d'étalonnage au moins sont nécessaires pour chaque facteur 10 de masse moléculaire; cinq points de mesure au moins sont requis pour la courbe dans son ensemble, qui doit couvrir la masse moléculaire estimée de l'échantillon. Le point extrême de la courbe d'étalonnage du côté des faibles masses moléculaires peut être défini grâce au n-hexylbenzène ou à un autre soluté non polaire approprié. Les masses moléculaires moyennes en nombre et en poids sont généralement déterminées par un traitement électronique des données fondé sur les formules décrites dans la section 1.2. Si on a recours à un traitement manuel, il est opportun de consulter l'ASTM D 3536-91 (3).

La courbe de distribution doit être présentée sous la forme d'un tableau ou d'un graphique (fréquence différentielle ou pourcentages cumulatifs en fonction du log M). Dans la représentation graphique, une puissance de dix de masse moléculaire doit normalement correspondre à une largeur de 4 cm environ tandis que pour le maximum du pic une hauteur de 8 cm environ est adéquate. Dans le cas de courbes de distribution cumulatives, la différence entre 0 et 100 pour cent sur l'axe des ordonnées doit être d'environ 10 cm.

2.2. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai doit comporter les renseignements suivants:

2.2.1. **Substance à tester**

— renseignements disponibles sur la substance à tester (nature, additifs, impuretés),

▼B

— description du traitement de l'échantillon, observations, problèmes.

2.2.2. **Dispositif expérimental**

— réservoir d'éluant, gaz inerte, dégazage de l'éluant, composition de l'éluant, impuretés,

— pompe, amortisseur d'impulsions, système d'injection,

— colonnes de séparation (fabricant, toutes précisions sur les caractéristiques des colonnes, telles que taille des pores, nature du matériel de séparation etc., nombre, longueur et ordre des colonnes utilisées),

— nombre de plateaux théoriques de la colonne (ou de la combinaison de colonnes), efficacité de la séparation (résolution du système),

— informations sur la symétrie des pics,

— température de la colonne, mode de régulation de la température,

— détecteur (principe de mesure, type, volume de la cuvette),

— débitmètre, s'il y en a un (fabricant, principe de mesure),

— système utilisé pour rassembler et pour traiter les données (matériel et logiciel).

2.2.3. **Étalonnage du système**

— description détaillée de la méthode utilisée pour établir la courbe d'étalonnage,

— précisions sur les critères de qualité propres à cette méthode (par exemple, coefficient de corrélation, erreur quadratique moyenne, etc.),

— informations sur toutes les extrapolations, hypothèses et approximations effectuées au cours de la procédure expérimentale, ainsi que sur l'évaluation et le traitement des données,

— toutes les mesures effectuées pour établir la courbe d'étalonnage doivent être présentées dans un tableau qui comporte, pour chaque point d'étalonnage, les informations suivantes:

  — nom de l'échantillon,

  — fabricant de l'échantillon,

  — valeurs caractéristiques M_p, M_n, M_w, M_w/M_n des étalons fournis par le fabricant ou déduites de mesures ultérieures, complétées d'indications relatives à la méthode de détermination,

  — volume d'injection et concentration d'injection,

▼B

— valeur de M_p utilisée pour l'étalonnage,

— volume d'élution ou temps de rétention corrigé mesuré aux maxima des pics,

— M_p calculée au maximum du pic,

— pourcentage d'erreur sur la M_p calculée et sur la valeur d'étalonnage.

2.2.4. **Évaluation**

— évaluation en fonction du temps: toutes méthodes visant à améliorer la reproductibilité requise (méthode de correction, étalon interne, etc.),

— préciser si l'évaluation a été effectuée à partir du volume d'élution ou à partir du temps de rétention,

— indiquer les limites de l'évaluation si un pic n'est pas complètement analysé,

— décrire les méthodes de lissage lorsqu'on y a recours,

— décrire les procédés de préparation et de prétraitement de l'échantillon,

— indiquer la présence de particules non dissoutes, s'il y en a,

— indiquer le volume d'injection (µl) et la concentration d'injection (mg/ml),

— mentionner les observations témoignant d'effets qui engendrent des déviations par rapport au profil idéal de chromatographie sur gel perméable,

— décrire en détail toutes les modifications aux procédures d'essais,

— préciser les intervalles d'erreur,

— consigner toutes autres informations et observations utiles pour interpréter les résultats.

3. **RÉFÉRENCES**

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J. and Bly, D.D. (eds) (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley & Sons.

(3) ASTM D 3536-91 (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, Pennsylvanie.

(4) ASTM D 5296-92 (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrène by High Performance Size-Exclusion Chromatography, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, Pennsylvanie.

▼B

Annexe

Exemples d'autres méthodes de détermination de la masse moléculaire moyenne en nombre (M_n) des polymères

La chromatographie sur gel perméable constitue la méthode de choix pour la détermination de M_n, en particulier lorsqu'on dispose d'un ensemble de substances étalons de structure comparable à la structure du polymère. Toutefois, lorsque le recours à la chromatographie sur gel perméable présente des difficultés pratiques ou que l'on peut s'attendre à ce que la substance ne satisfasse pas à un critère réglementaire pour la M_n (ce qui demande confirmation), il existe des méthodes de remplacement, par exemple:

1. **Utilisation des propriétés colligatives**

1.1. Ébullioscopie et cryoscopie:

consistent à mesurer l'élévation du point d'ébullition (ébullioscopie) ou l'abaissement du point de congélation (cryoscopie) d'un solvant lorsque le polymère est ajouté. La méthode est basée sur le fait que la dissolution d'un polymère dans un liquide exerce sur les points d'ébullition et de congélation de celui-ci un effet qui dépend de la masse moléculaire du polymère (1) (2).

Le domaine d'application correspond à $M_n < 20\,000$.

1.2. Abaissement de la pression de vapeur:

consiste à mesurer la pression de vapeur d'un liquide de référence avant et après addition de quantités connues de polymères (1) (2).

Le domaine d'application correspond à $M_n < 20\,000$ (théoriquement; en pratique, ne présente toutefois qu'une valeur limitée).

1.3. Osmométrie à membrane:

repose sur le principe de l'osmose, à savoir la tendance naturelle des molécules de solvant à traverser une membrane semi-perméable à partir d'une solution diluée vers une solution concentrée de manière à réaliser l'équilibre. Dans l'essai, la concentration de la solution diluée est nulle tandis que la solution concentrée contient le polymère. Le passage de solvant à travers la membrane induit une différence de pression qui dépend de la concentration et de la masse moléculaire du polymère (1) (3) (4).

Le domaine d'application correspond à des valeurs de M_n comprises entre 20 000 et 200 000.

1.4. Osmométrie en phase vapeur:

consiste à comparer la vitesse d'évaporation d'un aérosol de solvant pur à celle de trois aérosols au moins contenant le polymère à différentes concentrations (1) (5) (6).

Le domaine d'application correspond à $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Analyse des groupes terminaux**

Pour utiliser cette méthode, il est nécessaire de connaître à la fois la structure globale du polymère et la nature des groupes terminaux situés en bout de chaîne (ceux-ci doivent pouvoir être distingués de ta chaîne principale par exemple, par leur spectre RMN ou par titrage et formation de dérivés). La détermination de la concentration moléculaire des groupes terminaux présents sur le polymère peut, ensuite, fournir une valeur de la masse moléculaire (7) (8) (9).

Le domaine d'application correspond a des valeurs de M_n pouvant atteindre 50 000 (avec une fiabilité décroissante).

3. **Références de l'annexe**

(1) Billmeyer, F.W. Jr. (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.

(2) Glover, C.A. (1975). Absolute Colligative Property Methods, Chapter 4, in Polymer Molecular Weights, Part I (ed. P.E. Slade, Jr.), Marcel Dekker, New York.

(3) ASTM D 375-79 (1979). Standard Practice for Détermination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane osmometry, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, Pennsylvanie.

(4) Coll, H. (1989). Membrane osmometry, in: Détermination of Molecular Weight (ed. A.R. Cooper), J. Wiley and Sons, pp. 25-52.

(5) ASTM D 3592-77 (1977). Standard recommended practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, Pennsylvanie.

(6) Morris, C.E.M. (1989). Vapour Pressure Osmometry in Determination of Molecular Weight (ed. A.R. Cooper), J. Wiley and Sons.

(7) Schröder, E. Müller, G. & Arndt, K.-F. (1989). Polymer Characterisadon, Carl Hanser Verlag, Munich.

(8) Garmon, R.G. (1975). End-Group Determinations, Chapter 3 in Polymer Molecular Weights, Part I, (ed. P.E. Slade, Jr.) Marcel Dekker, New York.

(9) Amiya, S. et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

▼B

A.19. **DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN POLYMÈRES DE FAIBLE MASSE MOLÉCULAIRE**

1. **MÉTHODE**

Cette méthode de chromatographie sur gel perméable reprend la ligne directrice OCDE TG 118 (1996). On trouvera dans les références les principes fondamentaux et autres renseignements techniques.

1.1. INTRODUCTION

Les propriétés des polymères sont tellement diversifiées qu'il est impossible de décrire une méthode unique indiquant avec précision des conditions de séparation et d'évaluation qui recouvrent toutes les éventualités et particularités rencontrées dans la séparation des polymères. Les systèmes complexes de polymères, notamment, se prêtent rarement à la chromatographie sur gel perméable. Lorsque la chromatographie sur gel perméable n'est pas applicable, on peut déterminer la teneur en polymères de faible masse moléculaire à l'aide d'autres méthodes. Dans de tels cas, il convient de fournir tous les détails de la méthode utilisée et de justifier son choix.

La méthode décrite ci-après est basée sur la norme DIN 55672 (1). Celle-ci fournit des indications détaillées sur la manière de réaliser les expériences et d'évaluer les données. S'il est nécessaire de modifier les conditions expérimentales, ces changements doivent être justifiés. D'autres normes peuvent être utilisées, à condition d'en mentionner toutes les références. La méthode décrite fait appel à des échantillons de polystyrène de polydispersité connue pour l'étalonnage et il y aura peut-être lieu de la modifier pour l'adapter aux cas de polymères particuliers, par exemple, les polymères solubles dans l'eau et les polymères ramifiés à longue chaîne.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

On définit arbitrairement une masse moléculaire faible comme étant une masse moléculaire inférieure à 1 000 daltons.

La masse moléculaire moyenne en nombre M_n et la masse moléculaire moyenne en poids M_w sont déterminées à l'aide des équations suivantes:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i / M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

où

H_i est l'amplitude du signal du détecteur, par rapport au niveau de référence, correspondant au volume de rétention V_i, par rapport au niveau de référence.

M_i est la masse moléculaire de la fraction de polymère correspondant au volume de rétention, V_i et n est le nombre de points expérimentaux.

La largeur de la distribution des masses moléculaires, qui représente une mesure de la polydispersité du système, est donnée par le rapport M_W/M_n.

▼B

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

La méthode par chromatographie sur gel perméable étant une méthode relative, il est nécessaire de procéder à un étalonnage. Celui-ci est généralement effectué au moyen de polystyrènes étalons à chaîne linéaire et à distribution étroite, dont les masses moléculaires moyennes M_n et M_w, ainsi que la distribution des masses moléculaires sont connues. La courbe d'étalonnage ne peut être utilisée pour déterminer la masse moléculaire d'un échantillon inconnu que si les conditions de séparation des échantillons et des étalons ont été sélectionnées de manière identique.

Une relation déterminée entre la masse moléculaire et le volume d'élution n'est valable que dans les conditions particulières d'une expérience donnée. Parmi ces conditions figurent, avant tout, la température, le solvant (ou le mélange de solvants), les conditions de chromatographie, ainsi que la colonne de séparation ou le système de colonnes.

Les masses moléculaires de l'échantillon déterminées de cette manière constituent des valeurs relatives; on les désigne par le terme «masses moléculaires en équivalent-polystyrène». Cela signifie qu'en fonction des différences chimiques et structurelles entre l'échantillon à tester et les étalons, les masses moléculaires peuvent dévier des valeurs absolues de manière plus ou moins importante. Si d'autres étalons sont utilisés, par exemple le poly-éthylèneglycol, le poly(éthylène oxyde), le poly(méthacrylate de méthyle) ou l'acide polyacrylique, il importe d'en indiquer la raison.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La chromatographie sur gel perméable permet de déterminer la distribution des masses moléculaires ainsi que les masses moléculaires moyennes (M_n, M_w). La chromatographie sur gel perméable constitue un type particulier de chromatographie liquide dans lequel l'échantillon à tester est séparé en fonction des volumes hydrodynamiques de chaque constituant (2).

La séparation s'effectue à mesure que l'échantillon progresse dans une colonne remplie d'un matériau poreux, généralement un gel organique. Les petites molécules peuvent pénétrer dans les pores tandis que les grosses molécules en sont exclues. Le parcours des grosses molécules est, de ce fait, plus court; elles sont éluées en premier lieu. Les molécules de taille moyenne pénètrent dans certains des pores; elles sont éluées plus tard. Les molécules les plus petites, dont le rayon hydrodynamique moyen est plus petit que les pores du gel, peuvent pénétrer dans tous les pores. Elles sont éluées en dernier lieu.

Dans la situation idéale, c'est la taille des espèces moléculaires qui régit entièrement la séparation, mais, en pratique, il est difficile d'éviter l'interférence de certains effets d'absorption au moins. Un remplissage irrégulier de la colonne, de même que des volumes morts, peuvent aggraver la situation (2).

La détection s'effectue, par exemple, par mesure de l'indice de réfraction ou de l'absorption dans l'UV pour donner une courbe de distribution simple. Cependant, pour pouvoir associer à la courbe des valeurs de masses moléculaires réelles, il est nécessaire d'étalonner la colonne par passage de polymères de masse moléculaire connue et, idéalement, d'une structure aussi proche que possible. Une courbe de Gauss en résulte généralement; elle présente parfois une dissymétrie marquée du coté des masses moléculaires faibles, l'axe vertical indiquant la quantité, en poids, des espèces de différentes masses moléculaires éluées, tandis que sur l'axe horizontal figure le logarithme de la masse moléculaire.

▼B

La teneur en polymères de faible masse moléculaire est déduite de cette courbe. Le calcul ne peut être exact que si les espèces à faible masse moléculaire se comportent de la même manière, par unité de masse, que l'ensemble du polymère.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

La reproductibilité (écart-type relatif) du volume d'élution doit être au plus égale à 0,3 pour cent. Il y a lieu d'améliorer la reproductibilité de l'analyse grâce à une correction mettant en jeu un étalon interne, si un chromatogramme est évalué en fonction du temps et ne satisfait pas aux critères mentionnés plus haut [voir informations complémentaires en (1)]. Les polydispersités dépendent des masses moléculaires des étalons; dans le cas des polystyrènes étalons:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p est la masse moléculaire de l'étalon correspondant au maximum du pic)

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Préparation des solutions de polystyrène étalon**

On dissout les polystyrènes étalons en les mélangeant soigneusement à l'éluant choisi. On préparera les solutions en observant les recommandations du fabricant.

Les concentrations des étalons choisis dépendent de différents facteurs, comme le volume d'injection, la viscosité de la solution et la sensibilité du détecteur. Le volume d'injection maximum doit être adapté à la longueur de la colonne, en veillant à ne pas surcharger celle-ci. Les volumes d'injection courants pour des séparations analytiques par chromatographie sur gel perméable, au moyen d'une colonne de 30 cm × 7,8 mm, varient normalement entre 40 et 100 µl. Il est possible d'injecter des volumes plus importants, mais ceux-ci ne peuvent dépasser 250 µl. On doit déterminer le rapport optimal entre le volume d'injection et la concentration avant l'étalonnage de la colonne.

1.6.2. **Préparation de la solution de l'échantillon**

En principe, la préparation des solutions de l'échantillon s'effectue selon les mêmes critères. L'échantillon est dissous dans un solvant approprié, par exemple le THF, en agitant soigneusement. Il ne doit, en aucun cas, être dissous dans un bain à ultrasons. Si nécessaire, la solution de l'échantillon est purifiée au moyen d'un filtre à membrane d'une dimension de pores comprise entre 0,2 et 2 µm.

La présence de particules non dissoutes doit être mentionnée dans le rapport final, dans la mesure où elle peut résulter d'espèces de masse moléculaire élevée. Il faut recourir à une méthode appropriée pour déterminer le pourcentage en poids des particules non dissoutes. Les solutions doivent être analysées dans un délai de 24 heures.

▼B

1.6.3. **Correction liée à la présence d'impuretés et d'additifs**

S'agissant de la teneur en espèces de M < 1 000, il est généralement nécessaire d'apporter une correction pour tenir compte de la présence de composés particuliers non polymériques (par exemple des impuretés ou des additifs), sauf si la teneur mesurée n'excède pas un pour cent. Cette correction peut être réalisée par analyse directe de la solution de polymère ou de l'éluat de la chromatographie sur gel perméable.

Au cas où l'éluat est trop dilué pour permettre une analyse après passage à travers la colonne, il convient de le concentrer. Il est éventuellement nécessaire d'évaporer l'éluat à sec puis de le redissoudre. La concentration de l'éluat sera effectuée dans des conditions telles qu'aucune modification de sa composition n'intervienne. Le traitement de l'éluat après la phase de chromatographie sur gel perméable est fonction de la méthode d'analyse utilisée pour la détermination quantitative.

1.6.4. **Appareillage**

Un appareil de chromatographie sur gel perméable se compose des éléments suivants:

— un réservoir à solvant,

— un système de dégazage (si nécessaire),

— une pompe,

— un amortisseur d'impulsions (si nécessaire),

— un système d'injection,

— des colonnes de chromatographie,

— un détecteur,

— un débimètre (si nécessaire),

— un système d'enregistrement et de traitement des données,

— un récipient pour recueillir les solutions usées.

On doit vérifier que le système de chromatographie sur gel perméable est inerte vis-à-vis du solvant utilisé (par exemple, utilisation de capillaires en acier lorsque le solvant est le THF).

1.6.5. **Injection et système de pompage du solvant**

Un volume défini de la solution de l'échantillon est chargé sur la colonne dans une zone étroitement définie, à l'aide d'un échantillonneur automatique ou manuellement. Si on opère manuellement, le fait de retirer ou d'enfoncer le piston de la seringue trop rapidement peut provoquer des modifications dans la distribution des masses moléculaires observées. Le système de pompage du solvant doit, dans toute la mesure du possible, être exempt de pulsations; il est souhaitable qu'il comporte un amortisseur d'impulsions. Le débit est de l'ordre de 1 ml/min.

1.6.6. **Colonne**

Selon la nature de l'échantillon à tester, le polymère est caractérisé en ayant recours à une seule colonne ou à plusieurs colonnes connectées en série. Un certain nombre de matériaux poreux pour colonne de propriétés définies (par exemple taille des pores, limites d'exclusion) sont disponibles dans le commerce. Le choix du gel de séparation ou celui de la longueur de la colonne dépendent, d'une part, des propriétés de l'échantillon à tester (volumes hydrodynamiques, distribution des masses moléculaires), d'autre part, des conditions particulières de la séparation, telles que la nature du solvant, la température et le débit (1) (2) (3).

▼B

1.6.7. **Plateaux théoriques**

La colonne ou la combinaison de colonnes utilisée pour la séparation doit être caractérisée par le nombre de plateaux théoriques. Pour ce faire, dans le cas où le solvant d'élution est le THF, il y a lieu de faire passer une solution d'éthylbenzène ou d'un autre soluté non polaire approprié sur une colonne de longueur connue. Le nombre de plateaux théoriques est donné par l'équation suivante:

$$N = 5{,}54\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad \text{ou} \qquad N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

où

N est le nombre de plateaux théoriques

V_e est le volume d'élution correspondant au maximum du pic

W est la largeur du pic au niveau de la ligne de base

$W_{1/2}$ est la largeur du pic à mi-hauteur.

1.6.8. **Efficacité de la séparation**

Outre le nombre de plateaux théoriques, paramètre déterminant la largeur de bande, l'efficacité de séparation est une autre grandeur caractéristique; c'est la pente de la courbe de calibrage qui la détermine. L'efficacité de séparation d'une colonne se détermine au moyen de la relation suivante:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{section de la colonne}} \geq 6{,}0\left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

où

V_{eM_x} est le volume d'élution du polystyrène de masse moléculaire M_x

$V_{e,(10.M_x)}$ est le volume d'élution du polystyrène de masse moléculaire 10 fois supérieure.

La résolution du système est généralement définie comme suit:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

où.

V_{e1}, V_{e2} sont les volumes d'élution des deux polystyrènes étalons au maximum du pic.

W_1, W_2 sont les largeurs des pics au niveau de la ligne de base.

M_1, M_2 sont les masses moléculaires correspondant au maximum des pics (elles doivent différer d'un facteur 10).

La valeur de R pour le système de colonnes doit être supérieure à 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Solvants**

Tous les solvants doivent être d'une grande pureté (on emploie du THF à 99,5 pour cent de pureté}. Le réservoir de solvant (mis, au besoin, sous atmosphère de gaz inerte) doit être assez grand pour permettre l'étalonnage de la colonne et plusieurs analyses d'échantillons. Le solvant sera dégazé avant d'être pompe vers la colonne.

1.6.10. **Régulation de la température**

La température des composants internes critiques [boucle d'injection, colonne(s), détecteur et tuyaux] doit être constante et compatible avec le choix du solvant.

1.6.11. **Détecteur**

Le détecteur sert à enregistrer de manière quantitative la concentration de l'échantillon qui est élué de la colonne. En vue d'éviter un élargissement indésirable des pics, le volume de la cuvette du détecteur sera choisi aussi petit que possible. Il ne doit pas excéder 10 µl, sauf pour les détecteurs par diffusion de la lumière et les viscosimètres. La détection s'effectue généralement par réfractométrie différentielle. Toutefois, si les propriétés spécifiques de l'échantillon ou du solvant d'élution l'exigent, d'autres types de détecteurs peuvent être utilisés tels que les détecteurs UV/VIS ou IR, les viscosimètres, etc.

2. **RÉSULTATS ET PROCÈS-VERBAL D'ESSAI**

2.1. RÉSULTATS

On se référera à la norme DIN (1) pour ce qui concerne les critères d'évaluation détaillés, de même que pour les spécifications relatives à la collecte et au traitement des données.

Pour chaque échantillon analysé, on réalisera deux expériences indépendantes. Leurs résultats seront analysés séparément.

Il est nécessaire d'indiquer explicitement que les valeurs mesurées sont des valeurs relatives correspondant a des équivalents de masse moléculaire de l'étalon utilisé.

Dans tous les cas, il est essentiel de déterminer aussi les données relatives aux blancs, ceux-ci étant traités de la même manière que les échantillons.

Après avoir déterminé les volumes et les temps de rétention (éventuellement corrigés au moyen d'un étalon interne), on porte en graphique les valeurs de log M_p (M_p représentant les maxima des pics des polymères d'étalonnage) en fonction de l'une de ces quantités. Deux points d'étalonnage au moins sont nécessaires pour chaque facteur 10 de masse moléculaire; cinq points de mesure au moins sont requis, pour la courbe dans son ensemble qui doit couvrir la masse moléculaire estimée de l'échantillon. Le point extrême de la courbe d'étalonnage du côté des faibles masses moléculaires peut être défini grâce au n-hexylbenzène ou à un autre soluté non polaire approprié. On détermine la portion de la courbe correspondant aux masses moléculaires inférieures à 1 000 et on la corrige, si nécessaire, pour tenir compte des impuretés et des additifs. Les courbes d'élution sont généralement évaluées au moyen d'un système électronique de traitement des données. Si on a recours à un traitement manuel, il est opportun de consulter l'ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Si un polymère insoluble est retenu sur la colonne, sa masse moléculaire est vraisemblablement supérieure à celle de la fraction soluble et il faut en tenir compte pour éviter de surestimer la teneur en polymères de faible masse moléculaire. On trouvera en annexe des indications permettant de corriger la teneur en polymères de faible masse moléculaire pour tenir compte des polymères insolubles.

La courbe de distribution doit être présentée sous la forme d'un tableau ou d'un graphique (fréquence-différentielle ou pourcentages cumulatifs en fonction du log M). Dans la représentation graphique, une puissance de dix de masse moléculaire doit normalement correspondre à une largeur de 4 cm environ, tandis que pour le maximum du pic une hauteur de 8 cm environ est adéquate. Dans le cas de courbes de distribution cumulatives, la différence entre 0 et 100 pour cent sur l'axe des ordonnées doit être d'environ 10 cm.

2.2. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai doit comporter les renseignements suivants:

2.2.1. **Substance à tester**

— renseignements disponibles sur la substance à tester (nature, additifs, impuretés),

— description du traitement de l'échantillon, observations, problèmes.

2.2.2. **Dispositif expérimental**

— réservoir d'éluant, gaz inerte, dégazage de l'éluant, composition de l'éluant, impuretés,

— pompe, amortisseur d'impulsions, système d'injection,

— colonnes de séparation (fabricant, toutes précisions sur les caractéristiques de la colonne, telles que taille des pores, nature du matériel de séparation, etc., nombre, longueur et ordre des colonnes utilisées),

— nombre de plateaux théoriques de la colonne (ou de la combinaison de colonnes), efficacité de la séparation (résolution du système),

— informations sur la symétrie des pics,

— température de la colonne, mode de régulation de la température,

— détecteur (principe de mesure, type, volume de la cuvette),

— débitmètre s'il y en a un (fabricant, principe de mesure),

— système utilisé pour rassembler et pour traiter les données (matériel et logiciel).

2.2.3. **Étalonnage du système**

— description détaillée de la méthode utilisée pour établir la courbe d'étalonnage,

▼B

— précisions sur les critères de qualité propres à cette méthode (par exemple, coefficient de corrélation, erreur quadratique moyenne, etc.),

— informations sur toutes les extrapolations, hypothèses et approximations effectuées au cours des processus expérimentaux, ainsi que sur l'évaluation et le traitement des données,

— toutes les mesures effectuées pour établir la courbe d'étalonnage doivent être présentées dans un tableau qui comporte, pour chaque point d'étalonnage, les informations suivantes:

  — nom de l'échantillon,

  — fabricant de l'échantillon,

  — valeurs caractéristiques M_p, M_o, M_w, M_w/M_n des étalons fournies par le fabricant déduites de mesures ultérieures, complétées d'indications relatives à la méthode de détermination,

  — volume d'injection et concentration d'injection,

  — valeur de M_p utilisée pour l'étalonnage,

  — volume d'élution ou temps de rétention corrigé mesuré aux maxima des pics,

  — M_p calculée au maximum du pic,

  — pourcentage d'erreur sur la M_p calculée et sur la valeur d'étalonnage.

2.2.4. **Renseignements sur la teneur en polymères de faible masse moléculaire**

— description des méthodes d'analyse utilisées et de la manière dont les expériences ont été menées,

— informations sur le pourcentage que représente la teneur en espèces de faible masse moléculaire (poids/poids) par rapport à l'ensemble de l'échantillon,

— informations sur les impuretés, les additifs et les autres substances non polymériques en pourcentage pondéral de l'ensemble de l'échantillon.

2.2.5. **Évaluation**

— évaluation en fonction du temps: toutes méthodes visant à améliorer la reproductibilité requise (méthode de corrections, étalon interne, etc.),

— préciser si l'évaluation a été effectuée à partir du volume d'élution ou à partir du temps de rétention,

— indiquer les limites de l'évaluation si un pic n'est pas complètement analyse,

— décrire les méthodes de lissage lorsqu'on y a recours.

— décrire les procédés de préparation et de prétraitement de l'échantillon,

— indiquer la présence de particules non dissoutes, s'il y en a,

▼B

— indiquer le volume d'injection (µl) et la concentration d'injection (mg/ml),

— mentionner les observations témoignant d'effets qui engendrent des déviations par rapport au profil idéal de chromatographie sur gel perméable,

— décrire en détail toutes les modifications aux procédures d'essais,

— préciser les intervalles d'erreur,

— consigner toutes autres informations et observations utiles pour interpréter les résultats.

3. **RÉFÉRENCES**

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J. et Bly, D.D. (eds.) (1979). Modem Size Exclusion Liquid Chromatography, J.Wiley & Sons.

(3) ASTM D 3536-91 (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, Pennsylvanie.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, Pennsylvanie.

▼B

Annexe

Indications permettant de corriger la teneur en polymères de faible masse moléculaire pour tenir compte des polymères insolubles

La présence d'un polymère insoluble dans un échantillon entraîne une perte de masse au cours de l'analyse par chromatographie sur gel perméable. Le polymère insoluble est irréversiblement retenu sur la colonne ou sur le filtre à échantillon lorsque la partie soluble de l'échantillon traverse la colonne. Si l'indice de réfraction différentiel (dn/dc) du polymère peut être estimé ou mesuré, il est possible d'estimer la masse que l'échantillon a perdue sur la colonne. Dans ce cas, on effectue une correction à l'aide d'un étalonnage externe du réfractomètre, avec des étalons dont on connaît la concentration et le dn/dc. Dans l'exemple qui suit, on utilise un étalon de poly(méthacrylate de méthyle).

L'étalonnage externe pratiqué lors de l'analyse des polymères acryliques consiste à analyser par chromatographie sur gel perméable une solution étalon de concentration connue de poly(méthacrylate de méthyle) dans du tétrahydrofuranne; les résultats servent à calculer la constante du réfractomètre selon l'équation suivante:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

où

K = est la constante du réfractomètre (microvolts secondes/ml)

R = est la réponse de l'étalon de poly(méthacrylate de méthyle) (microvolts secondes)

C = est la concentration de l'étalon de poly(méthacrylate de méthyle) (mg/ml)

V = est le volume d'injection (ml) et

dn/dc = est l'indice de réfraction différentiel d'une solution de poly(méthacrylate de méthyle) dans du tétrahydrofuranne (ml/mg).

Les données suivantes caractérisent généralement un étalon de poly(méthacrylate de méthyle):

R = 2 937 891;

C = 1,07 mg/ml;

V = 0,1 ml;

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg.

La valeur de K résultante, $3{,}05 \times 10^{11}$, est ensuite utilisée pour calculer la réponse théorique du détecteur, c'est-à-dire celle qu'on obtiendrait si 100 pour cent du polymère injecté était élué à travers le détecteur.

▼B

A.20. COMPORTEMENT DE DISSOLUTION — EXTRACTION DES POLYMÈRES DANS L'EAU

1. MÉTHODE

La méthode décrite reprend la version révisée de la ligne directrice OCDE TG 120 (1997). On trouvera davantage de renseignements techniques en référence (1).

1.1. INTRODUCTION

Dans le cas de certains polymères, tels que les polymères en émulsion, un travail préparatoire initial peut être nécessaire avant utilisation de la méthode exposée. La méthode n'est pas applicable aux polymères liquides ni aux polymères qui réagissent avec l'eau dans les conditions d'essai.

Lorsque la méthode est difficile ou impossible à mettre en pratique, le comportement de dissolution-extraction des polymères peut être étudié par d'autres méthodes. Dans ce cas, la méthode utilisée devra être entièrement détaillée et justifiée.

1.2. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Néant

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le comportement de dissolution — extraction des polymères en milieu aqueux est déterminé par la méthode du flacon (voir A.6, Solubilité dans l'eau, méthode du flacon), en y apportant les modifications décrites ci-après.

1.4. CRITÈRES DE QUALITÉ

Néant

1.5. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.5.1. **Appareillage**

L'appareillage nécessaire à l'application de la méthode est le suivant:

— un dispositif permettant de réduire l'échantillon en poudre, tel qu'un broyeur produisant des particules de taille déterminée

— un système d'agitation avec possibilité de régler la température

— un système de filtration sur membrane

— un dispositif d'analyse

— des tamis normalisés.

1.5.2. **Préparation de la solution de l'échantillon**

Il convient de réduire d'abord un échantillon représentatif à l'état de particules d'une taille comprise entre 0,125 et 0,25 mm en utilisant des tamis appropriés. Il peut être nécessaire de refroidir pour garantir la stabilité de l'échantillon ou pour procéder au broyage. Les matériaux du type du caoutchouc peuvent être pulvérisés à la température de l'azote liquide (1).

S'il n'est pas possible d'obtenir des particules de la dimension requise, on doit s'efforcer de réduire autant que possible la taille des particules et consigner le résultat. Dans le rapport, il est nécessaire d'indiquer comment l'échantillon pulvérisé a été conservé avant l'analyse.

▼B

1.5.3. **Procédure**

On pèse trois échantillons de la substance à tester, de 10 g chacun, dans trois récipients pourvus de bouchons en verre et on ajoute 1 000 ml d'eau dans chacun des récipients. Si la manipulation de 10 g de polymère s'avère impossible, il convient d'utiliser la quantité la plus grande qui puisse être manipulée, le volume d'eau étant ajusté en proportion.

Les récipients sont soigneusement bouchés, puis agités à 20 °C. On doit employer un dispositif d'agitation qui puisse fonctionner à température constante. Après une période de 24 heures, le contenu de chaque récipient est centrifugé ou filtré et la concentration du polymère dans la phase aqueuse limpide est déterminée à l'aide d'une méthode d'analyse appropriée. S'il n'existe pas de méthode permettant une analyse adéquate de la phase aqueuse, on peut obtenir une estimation de la solubilité-extractibilité totale en pesant, après séchage, le résidu filtré ou le précipité centrifugé.

Il est également nécessaire de différencier au plan quantitatif les impuretés et les additifs, d'une part, et les espèces de faible masse moléculaire, d'autre part. Dans le cas d'une détermination par gravimétrie, il est important de réaliser un essai à blanc, c'est-à-dire sans utiliser la substance à tester, de manière à pouvoir tenir compte des résidus générés par la méthode expérimentale.

On peut déterminer de la même manière le comportement de dissolution — extraction des polymères dans l'eau à 37 °C à pH 2 et pH 9 tel que décrit pour l'expérience réalisée à 20 °C. Les valeurs de pH peuvent être obtenues par addition de tampons adéquats ou d'acides et de bases appropriés tels que l'acide chlorhydrique, l'acide acétique, les hydroxydes de sodium et de potassium de qualité pour analyse ou l'ammoniac.

Il convient de mener un ou deux essais, suivant la méthode d'analyse utilisée. Lorsqu'on dispose de méthodes suffisamment spécifiques pour l'analyse directe du polymère en phase aqueuse, un essai tel que décrit plus haut devrait suffire. Mais quand ces méthodes n'existent pas et que la détermination du comportement de dissolution-extraction du polymère ne peut se faire que par une analyse indirecte, c'est-à-dire uniquement par la détermination de la teneur en carbone organique total (COT) de l'extrait aqueux, il est nécessaire de réaliser un essai supplémentaire. Celui-ci doit aussi être effectué en trois exemplaires, avec des échantillons de polymère dix fois plus petits et les mêmes quantités d'eau que celles qui ont été utilisées dans le premier essai.

1.5.4. **Analyse**

1.5.4.1. *Essais réalisés sur des échantillons d'une seule taille*

Il est possible que l'on dispose de méthodes permettant une analyse directe des polymères en phase aqueuse. Sinon, l'analyse indirecte des polymères dissous ou extraits peut aussi être envisagée. Pour ce faire, on détermine la teneur totale en parties solubles et on la corrige pour tenir compte des substances non polymériques.

L'analyse de l'extrait aqueux pour déterminer la teneur totale en espèces polymériques peut être réalisée;

soit par une méthode suffisamment sensible, par exemple.

— la détermination du COT par la digestion au persulfate ou au dichromate pour donner du CO_2, suivie d'une estimation par IR ou d'une analyse chimique,

▼B

— la spectrométrie d'absorption atomique (SAA) ou son équivalent en émission d'un plasma couplé par induction (PCI), dans le cas des polymères contenant du silicium ou un métal,

— l'absorption UV ou la spectrofluorimétrie pour les polymères arylés,

— la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse pour les échantillons de faible masse moléculaire,

soit par évaporation à sec, sous vide, de l'extrait aqueux, suivie d'une analyse du résidu par spectroscopie (IR, UV, etc.) ou par SAA-PCI.

Si une telle analyse de la phase aqueuse est impossible, l'extrait aqueux sera obtenu au moyen d'un solvant organique non miscible à l'eau (un hydrocarbure chlore, par exemple). Le solvant est alors évaporé et le résidu analysé, par ex. par IR, UV ou SAA-PCI, pour déterminer sa teneur en polymère notifié. Tous les constituants de ce résidu qui s'avèrent être des impuretés ou des additifs doivent être soustraits dans le but de déterminer le degré de dissolution — extraction du polymère lui-même.

Lorsque de telles substances sont présentes en quantités relativement importantes, il peut être nécessaire de soumettre le résidu à une analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance ou en phase gazeuse, par exemple, afin de différencier ces impuretés des monomères et des dérivés des monomères présents, de telle sorte que la teneur réelle en ces dernières espèces puisse être déterminée.

Dans certains cas, une simple évaporation à sec du solvant organique, suivie de la pesée du résidu sec, peut suffire.

1.5.4.2. *Essais réalisés sur des échantillons de deux tailles différentes*

La teneur en carbone organique total doit être déterminée pour tous les extraits aqueux.

Une détermination par gravimétrie est réalisée sur la partie non dissoute ou non extraite de l'échantillon. Si, après la centrifugation ou la filtration du contenu de chaque récipient, des résidus de polymère adhèrent encore à la paroi d'un récipient, il faut rincer ce dernier avec le filtrat jusqu'à ce qu'il ne comporte plus aucune trace visible de résidus. Après quoi, le filtrat est à nouveau filtré ou centrifugé. Les résidus déposés sur le filtre ou dans le tube de centrifugation sont séchés à 40 ^{o}C sous vide et pesés. On poursuit le séchage jusqu'à obtention d'une masse constante.

2. **RÉSULTATS**

2.1. ESSAIS RÉALISÉS SUR DES ÉCHANTILLONS D'UNE SEULE TAILLE

Les résultats obtenus pour chacun des trois flacons, ainsi que les valeurs moyennes, doivent être consignés et exprimés en unités de masse par volume de solution (généralement en mg/l) ou en unités de masse par masse d'échantillon de polymère (habituellement en mg/g). En outre, la perte de masse de l'échantillon (calculée en divisant la masse du soluté par la masse de l'échantillon initial) sera également mentionnée. Les écarts-types relatifs doivent être calculés. Les diverses valeurs seront consignées à la fois pour le produit total (polymère + principaux additifs, etc.) et pour le polymère seul (à savoir, après soustraction de la contribution relative à de tels additifs).

▼B

2.2. ESSAIS RÉALISÉS SUR DES ÉCHANTILLONS DE DEUX TAILLES DIFFÉRENTES

Les différentes concentrations du carbone organique total dans les extraits aqueux provenant des deux séries de trois expériences, ainsi que la valeur moyenne pour chaque série, doivent être consignées et exprimées en unités de masse par volume de solution (généralement en mgC/l), ainsi qu'en unités de masse par masse de l'échantillon initial (généralement en mgC/g).

S'il n'y a pas de différence entre les résultats correspondant aux rapports taille de l'échantillon/volume d'eau élevés et bas, cela peut indiquer que tous les constituants susceptibles d'être extraits l'ont effectivement été. Si tel est le cas, une analyse directe n'est, en principe, pas nécessaire.

Les différentes masses des résidus doivent être consignées et exprimées en pourcentage des masses initiales des échantillons. On calculera les valeurs moyennes pour chaque expérience. La différence entre 100 et le pourcentage obtenu représente le pourcentage de matières solubles et extractibles dans les échantillons de départ.

3. **PROCÈS-VERBAL D'ESSAI**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai doit comporter les renseignements suivants:

3.1.1. **Substance à tester**

— renseignements disponibles sur la substance à tester (nature, additifs, impuretés, proportion d'espèces de faible masse moléculaire).

3.1.2. **Conditions expérimentales**

— description des méthodes utilisées et des conditions expérimentales,

— description des méthodes d'analyse et de détection.

3.1.3. **Résultats**

— résultats de solubilité — extractibilité en mg/l: toutes les valeurs et la valeur moyenne obtenues pour les essais d'extraction dans les différentes solutions, ventilées en polymères et impuretés, additifs, etc.,

— résultats de solubilité — extractibilité en mg/g de polymère,

— concentrations du carbone organique total dans les extraits aqueux, masse du soluté et pourcentages calculés, si on en fait la mesure,

— pH de chaque échantillon,

— informations sur les valeurs obtenues dans les essais à blanc,

— description des méthodes d'analyse et de détection,

— si nécessaire, mention de l'instabilité chimique de la substance à tester durant la procédure d'essai et durant la procédure d'analyse,

— toutes les informations importantes pour interpréter les résultats.

4. **RÉFÉRENCES**

(1) DIN 53733 (1976). Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen fur Prüfzwecke.

▼B

A.21. **PROPRIÉTÉS COMBURANTES (LIQUIDES)**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode vise à déterminer l'aptitude d'un liquide à accroître la vitesse de combustion ou l'intensité de la combustion d'une substance combustible, ou de provoquer l'inflammation spontanée d'une substance combustible avec laquelle il est mélangé de manière homogène. La méthode repose sur l'épreuve des Nations unies pour les liquides comburants (1) et en est l'équivalent. Toutefois, comme cette méthode A.21 est avant tout conçue pour satisfaire aux exigences du règlement 1907/2006, une seule substance de référence est nécessaire pour effectuer la comparaison. Il peut être nécessaire d'effectuer des tests et des comparaisons avec d'autres substances de référence lorsque les résultats du test doivent être utilisés à d'autres fins ([1]).

Il n'est pas nécessaire d'effectuer ce test lorsque l'examen de la formule structurale établit indubitablement que la substance est incapable de présenter une réaction exothermique avec un combustible.

Il est utile de disposer d'informations préliminaires sur les éventuelles propriétés explosives de la substance avant de pratiquer ce test.

Ce test ne s'applique pas aux solides, gaz, substances explosives ou hautement inflammables, ni aux peroxydes organiques.

Il n'est pas nécessaire d'effectuer ce test lorsque l'on dispose déjà, pour la substance concernée, des résultats de l'épreuve des Nations unies pour les liquides comburants (1).

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Le temps moyen de montée en pression est la moyenne des temps mesurés pour que le mélange testé produise une élévation de pression de 690 kPa à 2 070 kPa au-dessus de la pression atmosphérique.

1.3. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

La substance de référence est une solution aqueuse d'acide nitrique (qualité pour analyse) à 65 % (poids/poids) ([2]).

([1]) Comme par exemple dans le cadre du règlement des Nations unies sur les transports.
([2]) L'acide doit être titré avant l'essai, afin de confirmer sa concentration.

▼B

Le cas échéant, si l'expérimentateur prévoit que les résultats de ce test seront peut-être utilisés à d'autres fins ([1]), il peut également être indiqué de tester d'autres substances de référence ([2]).

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Le liquide à tester est mélangé avec de la cellulose fibreuse dans un rapport massique de 1 pour 1 et placé dans une bombe. Si le mélange s'enflamme spontanément lors du mélange ou du remplissage, il n'est pas nécessaire de poursuivre l'essai.

Si le mélange ne s'enflamme pas spontanément, il y lieu d'effectuer l'essai complet. Le mélange est chauffé dans la bombe et le temps moyen que met la pression pour s'élever de 690 kPa à 2 070 kPa au-dessus de la pression atmosphérique est déterminé. Ce résultat est comparé au temps moyen de montée en pression pour le mélange 1:1 de la (des) substance(s) de référence et de cellulose.

1.5 CRITÈRES DE QUALITÉ

Dans une série de cinq essais sur une substance, aucun résultat ne devrait s'écarter de plus de 30 % de la moyenne arithmétique. Les résultats qui diffèrent de plus de 30 % de la moyenne devraient être rejetés, la procédure de mélange et de remplissage améliorée et les essais répétés.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Préparation**

1.6.1.1. *Substance combustible*

Comme matériau combustible on utilise de la cellulose fibreuse séchée ayant une longueur de fibre comprise entre 50 et 250 µm pour un diamètre de 25 µm ([3]). On la fait sécher en couche de moins de 25 mm d'épaisseur à 105 °C pendant 4 heures jusqu'à obtention d'un poids constant, puis on la maintient dans un dessiccateur en présence de dessiccant jusqu'à refroidissement et utilisation. La teneur en eau doit être inférieure à 0,5 % en masse (rapportée au poids sec) ([4]). Si cela est nécessaire pour satisfaire à cette condition, la durée de séchage doit être prolongée ([5]). Le même lot de cellulose doit être utilisé tout au long des essais.

([1]) Comme par exemple dans le cadre du règlement des Nations unies sur les transports.
([2]) Par exemple: acide perchlorique à 50 % (poids/poids) et chlorate de sodium à 40 % (poids/poids) sont utilisés dans la référence 1.
([3]) Par exemple Cellulose en poudre Whatman pour chromatographie sur colonne CF 11, n° de catalogue 4021 050.
([4]) Confirmé par titrage Karl-Fisher par exemple.
([5]) On peut également obtenir cette teneur en eau, par exemple, en chauffant à 105 °C pendant 24 heures sous vide.

▼B

1.6.1.2. *Appareillage*

1.6.1.2.1. B o m b e

On doit disposer d'une bombe. Le dispositif d'essai est constitué par une bombe cylindrique en acier de 89 mm de longueur et de 60 mm de diamètre extérieur (voir figure 1). La bombe comporte deux plats usinés en des points diamétralement opposés (réduisant sa largeur à cet endroit à 50 mm), ce qui permet de l'immobiliser pour le serrage du bouchon de mise à feu et du bouchon à évent. Elle est alésée intérieurement à 20 mm et comporte aux deux extrémités un chambrage de 19 mm de profondeur taraudé au pas de 1 en tube normalisé BSP (British Standard Pipe) ou son équivalent métrique. Une prise de pression est vissée latéralement dans le corps de la bombe à 35 mm d'une extrémité, et à un angle de 90° par rapport aux plats. Elle se visse dans un chambrage de 12 mm de profondeur taraudé au pas de 1/2 en tube normalisé BSP (ou l'équivalent métrique). Si nécessaire, un joint en un matériau inerte est utilisé pour assurer l'étanchéité au gaz. La prise de pression fait saillie latéralement de 55 mm par rapport au corps de la bombe et elle est percée d'un trou axial de 6 mm. Elle comporte à son extrémité extérieure un chambrage taraudé pour recevoir un capteur de pression du type à diaphragme. Tout autre type de dispositif de mesure de la pression peut être utilisé, à condition qu'il résiste aux gaz chauds et produits de décomposition et qu'il puisse réagir à des accroissements de pression de 690 à 2 070 kPa en moins de 5 ms.

L'extrémité de la bombe la plus éloignée du raccord est fermée par un bouchon fileté qui porte deux électrodes, dont l'une est isolée du corps du bouchon et l'autre mise à la masse. L'autre extrémité est fermée par un disque de rupture en aluminium de 0,2 mm d'épaisseur (taré à une pression d'environ 2 200 kPa), maintenu en place par un bouchon comportant un évent de 20 mm. Si nécessaire, un joint inerte est utilisé pour assurer la bonne étanchéité entre le bouchon et la bombe. Un porte-bombe spécial (figure 2) permet de maintenir la bombe dans la position voulue pendant les essais. Il est généralement constitué par une embase en acier doux de 235 mm × 184 mm × 6 mm, sur laquelle est soudé obliquement un tube de section carrée (de 70 mm × 70 mm × 4 mm) de 185 mm de longueur.

À une extrémité du tube carré, on a enlevé une certaine longueur de métal sur deux faces opposées, ce qui laisse une longueur de 86 mm de tube carré prolongée par deux côtés plats. Les extrémités de ces plats sont coupées à 60° par rapport à l'axe du tube et soudées à la plaque d'embase. Une encoche de 22 mm de large et de 46 mm de profondeur est découpée sur un côté en haut du tube carré, de telle manière que lorsque la bombe repose sur le support, bouchon de mise à feu vers la base, le raccord de prise de pression vienne s'y loger. Une entretoise en acier de 30 mm de largeur et 6 mm d'épaisseur est soudée sur la paroi intérieure du tube du côté orienté vers le bas. Deux trous taraudés dans le côté opposé reçoivent des vis à molettes de 7 mm, qui servent à fixer la bombe. Deux rebords en acier de 12 mm de largeur et de 6 mm d'épaisseur, soudés sur les flancs du support à la base de la section carrée soutiennent la cuve par le fond.

▼B

1.6.1.2.2. Système d'allumage

Le système d'allumage est constitué par un enroulement de fil au Ni/Cr de 25 cm de longueur, de 0,6 mm de section, et d'une résistance électrique de 3,85 ohm/m. Le fil a été enroulé en forme de bobine sur un mandrin de 5 mm de diamètre; ses extrémités sont reliées aux électrodes du bouchon de mise à feu. La bobine doit avoir l'une des configurations présentées à la figure 3. La distance entre la face supérieure du bouchon et le point le plus bas de l'enroulement de chauffage doit être de 20 mm. Si les électrodes ne sont pas réglables en longueur, les deux sections de fil chauffant situées entre la bobine et la face supérieure du bouchon doivent être isolées par une gaine de céramique. Le fil doit être alimenté par une source électrique stable pouvant fournir une intensité d'au moins 10 A.

1.6.2. **Réalisation de l'essai** ([1])

La bombe montée, avec son capteur de pression, mais non fermée par son disque de rupture, est posée bouchon d'allumage vers le bas dans son support. On mélange 2,5 g du liquide à essayer avec 2,5 g de cellulose séchée dans un bécher en verre à l'aide d'un agitateur en verre ([2]). Pour des raisons de sécurité, lors de cette opération, le manipulateur devrait s'abriter derrière un écran de protection. Si le mélange s'enflamme spontanément au cours du mélange ou du remplissage, il n'est pas nécessaire de poursuivre l'essai. On remplit la bombe en plusieurs fois en tassant par petits chocs contre un objet dur; on s'assure qu'il n'y a pas de vide autour de l'enroulement de chauffage et que le mélange est directement en contact avec celui-ci. On doit cependant veiller à ne pas déformer l'enroulement en tassant le mélange car cela pourrait entraîner des résultats erronés ([3]). On met en place le disque de rupture et on visse le bouchon à évent en le bloquant. La bombe chargée est alors posée sur le porte-bombe, disque de rupture vers le haut, l'ensemble étant placé dans une hotte blindée ou dans une chambre de tir. On raccorde les bornes extérieures du bouchon de mise à feu à une source électrique et on applique au dispositif de chauffage un courant de 10 A. Il ne devrait pas s'écouler plus de 10 minutes entre le début de la préparation du mélange et le moment de la mise sous tension.

Le signal émis par le capteur de pression est enregistré sur un système permettant d'effectuer un enregistrement permanent de la courbe pression/temps et une analyse de cette courbe (enregistreur de signaux transitoires couplé à un enregistreur à bande de papier par exemple). Le mélange est chauffé jusqu'à rupture du disque ou pendant une durée d'au moins 60 s. S'il n'y a pas rupture, on doit attendre que le mélange ait refroidi avant d'ouvrir la bombe prudemment au cas où celle-ci serait encore sous pression. Cinq essais sont exécutés avec le mélange et avec chacune des substances de référence. On note le temps nécessaire pour monter de 690 kPa à 2 070 kPa (pression manométrique). Le temps moyen de montée en pression est calculé.

Dans certains cas, des substances peuvent engendrer une augmentation de pression (trop élevée ou trop faible), due à des réactions chimiques non caractéristiques des propriétés comburantes de ces substances. Il peut alors se révéler nécessaire de répéter l'épreuve en remplaçant la cellulose par une substance inerte, par exemple la diatomite (kieselguhr), afin de s'assurer de la nature de la réaction.

([1]) Les mélanges de substances comburantes avec de la cellulose doivent être traités comme potentiellement explosifs et manipulés avec le plus grand soin.

([2]) Dans la pratique, cela peut être réalisé en préparant un mélange 1:1 du liquide à essayer et de cellulose en quantité plus importante que ce qui est nécessaire pour l'essai et en transférant 5 ± 0,1 g dans la bombe. Un nouveau mélange doit être préparé pour chaque essai.

([3]) Il convient notamment d'éviter tout contact entre les spires adjacentes de la bobine.

▼B

2. **DONNÉES**

Temps de montée en pression à la fois pour la substance à essayer et pour la (les) substance(s) de référence. Temps de montée en pression pour les essais avec une substance inerte, le cas échéant.

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Le temps moyen de montée en pression est calculé à la fois pour la substance à essayer et pour la (les) substances(s) de référence.

Le temps moyen de montée en pression est calculé pour les essais réalisés, avec une substance inerte (le cas échéant).

Le tableau 1 présente quelques exemples.

Tableau 1

Exemples de résultats [a]

Substance [b]	Temps moyen de montée en pression pour un mélange 1:1 avec de la cellulose (ms)
Dichromate d'ammonium, solution aqueuse saturée	20 800
Nitrate de calcium, solution aqueuse saturée	6 700
Nitrate ferrique, solution aqueuse saturée	4 133
Perchlorate de lithium, solution aqueuse saturée	1 686
Perchlorate de magnésium, solution aqueuse saturée	777
Nitrate de nickel, solution aqueuse saturée	6 250
Acide nitrique, 65 %	4 767 [c]
Acide perchlorique, 50 %	121 [c]
Acide perchlorique, 55 %	59
Nitrate de potassium, 30 % solution aqueuse	26 690
Nitrate d'argent, solution aqueuse saturée	[d]
Chlorate de sodium, 40 % solution aqueuse	2 555 [c]
Nitrate de sodium, 45 % solution aqueuse	4 133
Substance inerte	
Eau: cellulose	[d]

[a] Voir référence (1) pour le classement au transport selon le système des Nations unies.
[b] Les solutions saturées doivent être préparées à 20 °C.
[c] Valeur moyenne d'après des essais interlaboratoires de comparaison.
[d] Pression maximale de 2 070 kPa non atteinte.

▼B

3. **COMPTE RENDU**

3.1. COMPTE RENDU DE L'ESSAI

Le compte rendu de l'essai doit comprendre les informations suivantes:

— l'identité, la composition, la pureté, etc. de la substance essayée,

— la concentration de la substance,

— la méthode de séchage de la cellulose employé,

— la teneur en eau de la cellulose utilisé,

— le résultat des mesures,

— le résultat des essais réalisés avec une substance inerte, le cas échéant,

— les temps moyens de montée en pression calculés,

— tout écart par rapport à cette méthode et les raisons de celui-ci,

— toute information ou remarque complémentaire présentant un intérêt pour l'interprétation des résultats.

3.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS ([1])

Pour l'évaluation des résultats, on se fonde:

a) sur le fait que le mélange substance à essayer/cellulose s'enflamme spontanément ou non;

b) sur la comparaison du temps moyen de montée de 690 kPa à 2 070 kPa (pression manométrique) avec le temps moyen obtenu pour la (les) substance(s) de référence.

Une substance liquide doit être considérée comme comburante lorsque:

a) un mélange 1:1, en poids, de la substance et de cellulose s'enflamme spontanément; ou

b) un mélange 1:1, en poids, de la substance et de cellulose présente un temps moyen de montée en pression inférieur ou égal au temps moyen de montée en pression d'un mélange 1:1, en poids, d'une solution aqueuse d'acide nitrique à 65 % (poids/poids) et de cellulose.

Afin d'éviter les faux positifs, il y a lieu, si nécessaire, de tenir également compte, lors de l'interprétation des résultats, des résultats obtenus dans les essais de la substance avec un matériel inerte.

([1]) Voir la référence 1 pour l'interprétation des résultats des essais effectués selon le règlement des Nations unies sur le transport, qui utilisent plusieurs substances de référence.

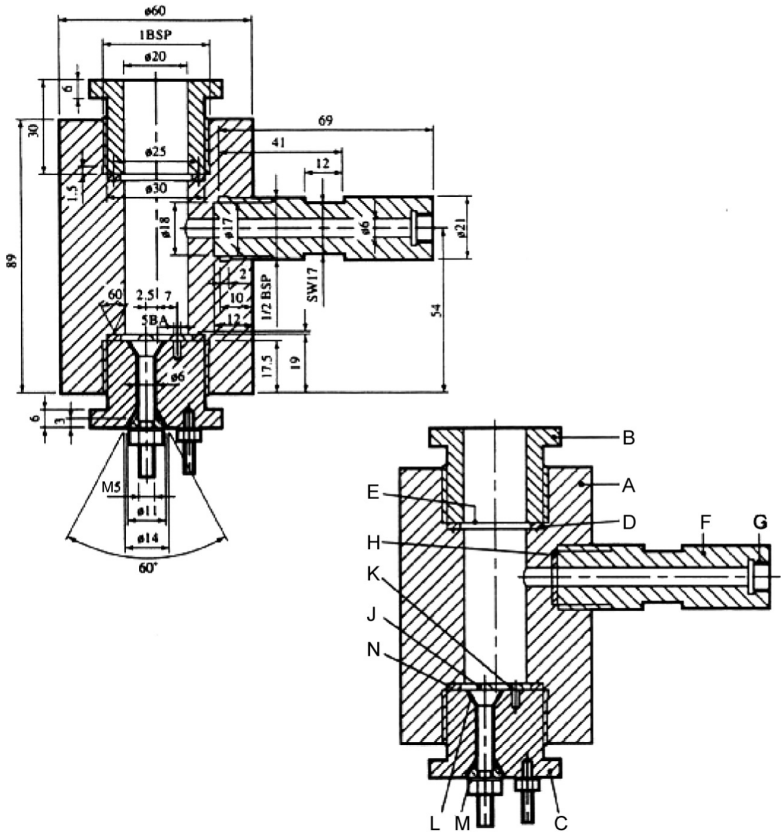
▼B

4. **RÉFÉRENCES**

(1) Recommandations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd revised edition. UN Publication No: ST/SG/AC.lO/11/Rev. 3, 1999, page 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

Figure 1

Bombe

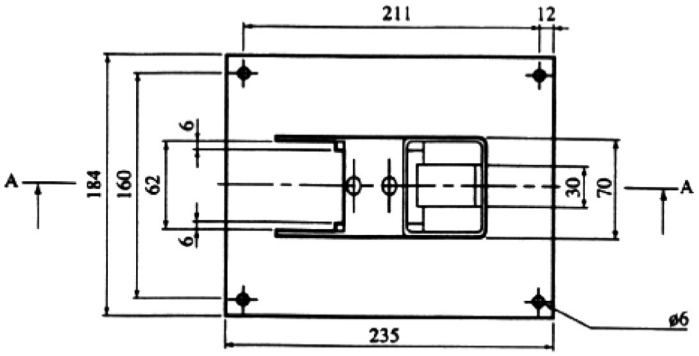


(A) Corps de la bombe	(B) Bouchon retenant le disque de rupture	(C) Bouchon de mise à feu
(D) Joint en plomb mou	(E) Disque de rupture	(F) Raccord de prise de pression
(G) Taraudage pour capteur de pression	(H) Joint	(J) Électrode isolée
(K) Électrode mise à la masse	(L) Isolation	(M) Cône en acier
(N) Rainure de matage du joint		

▼B

Figure 2

Porte-bombe



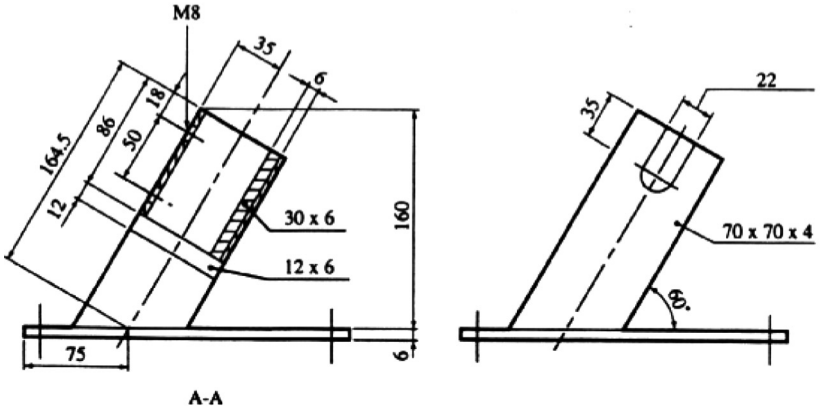
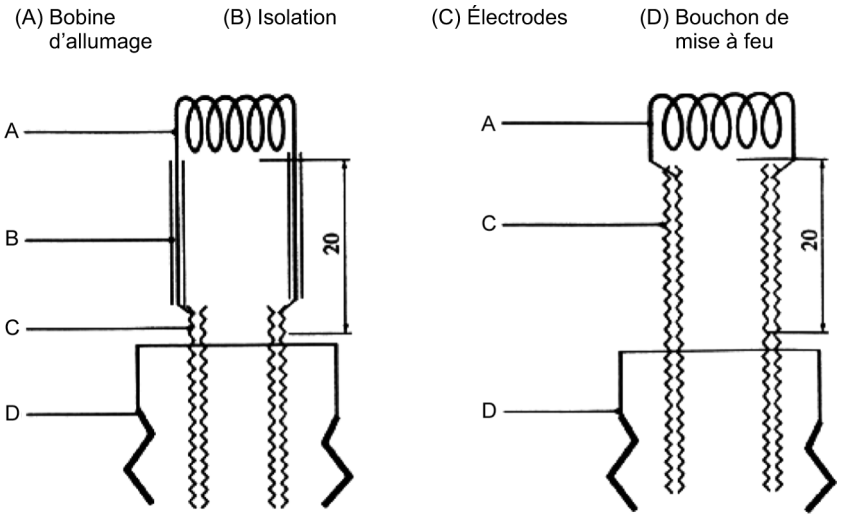


Figure 3

Système d'allumage



▼M1

A.22. DIAMÈTRE MOYEN GÉOMÉTRIQUE PONDÉRÉ PAR LA LONGUEUR DES FIBRES

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode décrit une procédure permettant de mesurer le diamètre moyen géométrique pondéré par la longueur (LWGMD) de fibres minérales artificielles (FMA) en vrac. Dans la mesure où le LWGMD de la population a une probabilité de 95 % d'être compris dans les limites de confiance à 95 % (LWGMD ± deux erreurs types) de l'échantillon, la valeur rapportée (valeur d'essai) sera la limite de confiance inférieure à 95 % de l'échantillon (c'est-à-dire LWGMD — deux erreurs types). Cette méthode repose sur une mise à jour (juin 1994) d'une ébauche de procédure industrielle du HSE approuvée lors d'une réunion entre l'ECFIA et le HSE, à Chester, le 26 septembre 1993, et développée aux fins et sur la base d'un deuxième essai interlaboratoire (1, 2). Cette méthode de mesure peut être utilisée pour caractériser le diamètre des fibres de substances ou de produits en vrac contenant des FMA, et notamment des fibres céramiques réfractaires (FCR), des fibres vitreuses artificielles (FVA) et des fibres cristallines et polycristallines.

La pondération par la longueur permet de compenser les répercussions sur la distribution du diamètre de la cassure des fibres longues lors de l'échantillonnage ou de la manipulation du matériau. Des statistiques géométriques (moyenne géométrique) sont utilisées pour mesurer la distribution des diamètres des FMA dans la mesure où cette distribution est en général proche de la loi log-normale.

La mesure de la longueur et du diamètre est une opération à la fois fastidieuse et longue, mais si seules les fibres en contact avec une ligne infiniment mince du champ de vision d'un MEB sont mesurées, la probabilité de sélectionner une fibre donnée est proportionnelle à sa longueur. Comme cette méthode tient compte de la longueur dans les calculs de pondération par la longueur, la seule mesure requise est le diamètre et le LWGMD-2ET peut être calculé comme décrit.

1.2. DÉFINITIONS

Particule: objet dont le rapport longueur/largeur est inférieur à 3:1.

Fibre: objet dont le rapport longueur/largeur (rapport d'aspect) est d'au moins 3:1.

1.3. PORTÉE ET LIMITATIONS

Cette méthode est conçue pour examiner la distribution des diamètres ayant un diamètre moyen compris entre 0,5 μm et 6 μm. Les diamètres supérieurs peuvent être mesurés à l'aide d'un grossissement inférieur du BEM, mais cette méthode est de plus en plus limitée à mesure que les distributions de fibres deviennent plus fines. Il est dès lors conseillé d'effectuer les mesures avec un microscope électronique à transmission (MET) si le diamètre moyen est inférieur à 0,5 μm.

▼M1

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Un certain nombre d'échantillons représentatifs sont prélevés sur un tissu en fibres ou dans un rembourrage en vrac. La longueur des fibres en vrac est réduite par pressage, puis un sous-échantillon représentatif est dispersé dans de l'eau. Des aliquotes sont extraites et filtrées à l'aide d'un filtre en polycarbonate à pores de 0,2 μm, avant d'être préparées pour l'examen à l'aide de techniques de microscopie électronique à balayage (MEB). Les diamètres des fibres sont mesurés grâce à un grossissement de l'écran de × 10 000 ou plus ([1]) à l'aide d'un échantillonnage linéaire, de manière à obtenir une estimation impartiale du diamètre moyen. L'intervalle de confiance inférieur à 95 % (sur la base d'un test unilatéral) est calculé afin d'obtenir une estimation de la valeur minimale du diamètre moyen géométrique des fibres du matériau.

1.5. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.5.1. **Sécurité/Précautions**

Il conviendra de réduire au minimum l'exposition aux fibres en suspension dans l'atmosphère, ainsi que d'utiliser une hotte ou une boîte à gants lors de la manipulation des fibres. Des contrôles périodiques de l'exposition du personnel seront réalisés afin de déterminer l'efficacité des méthodes de contrôle. Lors de la manipulation des FMA, le personnel portera des gants jetables afin de réduire les risques d'irritation cutanée et d'éviter toute contamination croisée.

1.5.2. **Appareillage/Équipement**

— Presses et matrices (capables de produire 10 MPa).

— Filtres en polycarbonate à pores capillaires de 0,2 μm (25 mm de diamètre).

— Filtre membrane en ester de cellulose à pores de 5 μm destiné à être utilisé comme filtre secondaire.

— Appareil de filtration en verre (ou systèmes de filtration jetables) conçus pour accueillir des filtres de 25 mm de diamètre (par exemple, kit de microanalyse en verre Millipore, type n° XX10 025 00).

— Eau fraîchement distillée et filtrée au travers d'un filtre à pores de 0,2 μm pour éliminer les micro-organismes.

— Pulvérisateur cathodique avec cible en or ou or/palladium.

— Microscope électronique à balayage avec une résolution pouvant descendre jusqu'à 10 nm et un grossissement × 10 000.

— Divers: spatules, lame de scalpel de type 24, petites pinces, tubes MEB, colle carbone ou papier adhésif carbone, argent colloïdal.

— Sonde ultrasonore ou bain d'ultrasons de laboratoire

— Sonde ou perce-bouchon pour prélever des échantillons dans le tissu de FMA

([1]) Cette valeur de grossissement est indiquée pour les fibres de 3 μm. Pour les fibres de 6 μm, un grossissement de × 5 000 peut s'avérer plus pertinent.

▼**M1**

1.5.3. **Procédure d'essai**

1.5.3.1. *Échantillonnage*

Pour les tissus et les bains, une sonde ou un perce-bouchon de 25 mm est utilisé pour prélever des échantillons de la coupe transversale. Les prélèvements doivent être effectués à des intervalles identiques sur toute la largeur d'une petite longueur de tissu ou être recueillis dans des zones aléatoires si de grandes longueurs sont disponibles. Le même équipement peut être utilisé pour extraire des échantillons aléatoires dans du rembourrage. Chaque fois que possible, six échantillons seront prélevés de manière à refléter les variations spatiales dans le matériau en vrac.

Les six échantillons doivent être pressés dans une matrice de 50 mm de diamètre à 10 MPa. Le matériau est ensuite mélangé à l'aide d'une spatule et pressé à nouveau à 10 MPa. Le matériau est ensuite retiré de la matrice et conservé dans une bouteille en verre hermétiquement fermée.

1.5.3.2. *Préparation de l'échantillon*

Si nécessaire, les liants organiques peuvent être éliminés en plaçant la fibre à l'intérieur d'un four à 450 °C pendant environ une heure.

Utilisez des cônes pour la délimitation et coupez des quarts pour subdiviser l'échantillon (cette opération doit être réalisée à l'intérieur d'une enceinte à poussières).

Avec une spatule, ajoutez une petite quantité (< 0,5 g) d'échantillon à 100 ml d'eau fraîchement distillée et filtrée à l'aide d'un filtre membrane de 0,2 µm (d'autres sources d'eau ultrapure peuvent être utilisées à condition qu'elles soient de qualité satisfaisante). Dispersez soigneusement à l'aide d'une sonde ultrasonore fonctionnant à 100 W et réglée pour produire une cavitation (si vous ne disposez pas de sonde, utilisez la méthode suivante: agitez à plusieurs reprises et retournez pendant 30 secondes; envoyez des ultrasons dans un bain d'ultrasons de laboratoire pendant cinq minutes: puis agitez à nouveau à plusieurs reprises et retournez pendant 30 secondes supplémentaires).

Directement après la dispersion de la fibre, retirez un certain nombre d'aliquotes (par exemple, trois aliquotes de 3, 6 et 10 ml) à l'aide d'une pipette à goulot large (capacité de 2-5 ml).

Filtrez sous vide chaque aliquote au travers d'un filtre en polycarbonate de 0,2 µm soutenu par un filtre secondaire MEC à pores de 5 µm, en utilisant un entonnoir de filtration en verre de 25 mm avec un réservoir cylindrique. Placez environ 5 ml d'eau distillée filtrée dans l'entonnoir et pipetez lentement l'aliquote dans l'eau en tenant l'embout de la pipette sous le ménisque. La pipette et le réservoir doivent être soigneusement nettoyés après le pipetage dans la mesure où les fibres minces ont tendance à se situer plus à la surface.

Retirez le filtre en douceur et séparez-le du filtre secondaire avant de le placer dans un récipient pour qu'il sèche.

▼M1

Coupez un quart ou une moitié de la section du dépôt filtré avec une lame de scalpel de type 24 par un mouvement d'oscillation. Fixez soigneusement la section coupée sur la plaque d'un MEB à l'aide d'adhésif ou de colle carbone. L'argent colloïdal doit être appliqué à au moins trois endroits afin d'améliorer le contact électrique sur les bords du filtre et de la plaque. Lorsque la colle/l'argent colloïdal est sec/sèche, pulvérisez cathodiquement environ 50 nm d'or ou d'or/palladium sur la surface du dépôt.

1.5.3.3. *Étalonnage et fonctionnement du MEB*

1.5.3.3.1. Étalonnage

L'étalonnage du MEB doit être vérifié au moins une fois par semaine (idéalement une fois par jour) à l'aide d'une grille d'étalonnage certifiée. Les valeurs de l'étalonnage doivent être comparées à une norme certifiée, et si la valeur mesurée (MEB) se situe en dehors de la plage de ± 2 % de la valeur certifiée, l'étalonnage du MEB doit être ajusté et une nouvelle fois vérifié.

Le MEB doit offrir au minimum une résolution d'un diamètre minimal visible de 0,2 µm, en utilisant une matrice de prélèvement réelle et à un grossissement de × 2 000.

1.5.3.3.2. Fonctionnement

Le MEB doit être utilisé à un grossissement de 10 000 ([1]) dans des conditions offrant une bonne résolution et une image acceptable à des vitesses de balayage réduites (par exemple, 5 secondes par trame). Bien que les conditions de fonctionnement de MEB différents puissent varier, il convient en général, pour obtenir les meilleures visibilité et résolution possibles avec des matériaux de poids atomique relativement faible, d'utiliser des tensions d'accélération de 5-10 keV avec une dimension du spot réduite et une petite distance de travail. Comme une traversée linéaire est réalisée, il convient d'utiliser une inclinaison de 0^{o} pour réduire au minimum le recentrage ou, si le MEB a une phase eucentrique, d'utiliser la distance de travail eucentrique. Un grossissement inférieur peut être utilisé si le matériau ne contient pas de petites fibres et que les diamètres des fibres sont importants (> 5 µm).

1.5.3.4. *Mesurage*

1.5.3.4.1. Examen à faible grossissement pour analyse de l'échantillon

Au départ, l'échantillon doit être examiné avec un faible grossissement afin de déterminer s'il y a agglutination des grandes fibres et pour déterminer la densité des fibres. En cas d'agglutination excessive, il est conseillé de préparer un nouvel échantillon.

Pour garantir la fiabilité des statistiques, il convient de mesurer un nombre minimal de fibres. Une densité élevée des fibres est souhaitable dans la mesure où l'examen de champs vides prend du temps et n'apporte rien à l'analyse. Cependant, si le filtre est surchargé, il peut devenir difficile de mesurer toutes les fibres mesurables. En outre, dans la mesure où les petites fibres risquent d'être cachées par les grandes, elles sont susceptibles de ne pas être vues.

([1]) Pour les fibres de 3 µm, voir la note de bas de page précédente.

▼**M1**

Une densité supérieure des fibres de 150 fibres par millimètre de traversée linéaire peut entraîner une surestimation du LWGMD. D'un autre côté, les faibles concentrations de fibres augmentent le temps d'analyse. Il est en outre souvent plus intéressant du point de vue du coût de préparer un échantillon d'une densité proche de la valeur optimale que de persister à dénombrer des filtres à faible concentration. La densité de fibres optimale doit donner une moyenne d'environ une ou deux fibres dénombrables par champ de vision à un grossissement de 5 000. Cependant, dans la mesure où la densité optimale dépend de la taille (diamètre) des fibres, l'opérateur devra décider si la densité des fibres est proche ou non de la valeur optimale.

1.5.3.4.2. Pondération par la longueur du diamètre des fibres

Seules les fibres qui touchent (ou traversent) une ligne (infiniment) mince tracée sur l'écran du MEB sont comptées. C'est la raison pour laquelle une ligne horizontale (ou verticale) est tracée en travers du centre de l'écran.

Il est également possible de placer un point unique au centre de l'écran et de procéder à un balayage continu dans une seule direction à travers le filtre. Toute fibre dont le rapport d'aspect est supérieur à 3:1 et qui touche ou traverse ce point voit son diamètre mesuré et enregistré.

1.5.3.4.3. Mesure des fibres

Il est recommandé de mesurer au moins 300 fibres. Chaque fibre est mesurée une seule fois, au point d'intersection avec la ligne ou le point tracé(e) sur l'image (ou à proximité du point d'intersection si les bords de la fibre sont cachés). Si des fibres présentant des coupes transversales non uniformes sont présentes, une mesure représentant le diamètre moyen de la fibre doit être utilisée. Le plus grand soin devra être accordé à la définition du bord et à la mesure de la distance la plus courte entre les bords des fibres. La mesure peut être effectuée en ligne ou hors ligne, sur des images ou des photos enregistrées. Il est recommandé d'utiliser des systèmes de mesure d'image semi-automatiques qui transfèrent directement les données dans une feuille de calcul, dans la mesure où ils permettent de gagner du temps, d'éviter les erreurs de transcription et d'automatiser les calculs.

Les extrémités des grandes fibres doivent être vérifiées à un grossissement plus faible afin de s'assurer qu'elles ne reviennent pas dans le champ de vision où est effectué le mesurage et qu'elles ne sont mesurées qu'une seule fois.

2. **DONNÉES**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

En général, les diamètres des fibres n'ont pas une distribution normale. Il est cependant possible d'obtenir une distribution proche de la normale en effectuant une transformation log.

Calculez la moyenne arithmétique (lnD moyenne) et l'écart-type (SD_{lnD}) du log par rapport aux valeurs de base (lnD) des diamètres des fibres n (D).

$$\text{moyen } \ln D = \frac{\sum \ln D}{n} \qquad (1)$$

▼**M1**

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\sum(lnD - \text{moyen } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

L'écart-type est divisé par la racine carrée du nombre de mesures (n) pour obtenir l'erreur type (ET_{lnD}).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Soustrayez deux fois l'erreur type de la moyenne et calculez l'exponentielle de cette valeur (moyenne moins deux erreurs types) pour obtenir la moyenne géométrique moins deux erreurs types géométriques.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{moyen } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **RÉSULTATS**

PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra au minimum les informations suivantes:

— la valeur de LWGMD-2ET,

— toutes les déviations, en particulier celles qui risquent d'affecter la précision et la fiabilité des résultats, ainsi que les justifications correspondantes.

4. **RÉFÉRENCES**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.

2. G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

▼M4

A.23 COEFFICIENT DE PARTAGE (1-OCTANOL/EAU): MÉTHODE DU BRASSAGE LENT

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 123 (2006) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La méthode du brassage lent a permis de déterminer avec exactitude des valeurs logarithmiques du coefficient de partage 1-octanol/eau (P_{OE}) allant jusqu'à 8,2 ([1]). Aussi constitue-t-elle une approche expérimentale appropriée pour la détermination directe du P_{OE} de substances fortement hydrophobes.

2. Les autres méthodes de détermination du coefficient de partage 1-octanol/eau (P_{OE}), sont la méthode par agitation en flacon (2) et la méthode par HPLC phase inverse (3). La méthode par agitation en flacon est sujette à des artéfacts dus au transfert de micro-gouttelettes d'octanol dans la phase aqueuse. Lorsque les valeurs du P_{OE} augmentent, la présence de ces gouttelettes dans la phase aqueuse engendre une surestimation croissante de la concentration de la substance d'essai dans l'eau. Aussi l'usage de cette méthode est-il limité aux substances dont le log P_{OE} est < 4. À partir de valeurs fiables du P_{OE} directement déterminées, la deuxième méthode étalonne la relation entre le temps de rétention sur la colonne HPLC et des valeurs mesurées du P_{OE}. Il existait un projet de ligne directrice de l'OCDE permettant de déterminer les coefficients de partage 1-octanol/eau de substances ionisables (4), mais il ne doit plus être utilisé.

3. La présente méthode d'essai a été élaborée aux Pays-Bas. La précision des méthodes décrites dans ce pays a été validée et optimisée au cours d'un essai tournant de validation auquel ont participé 15 laboratoires (5).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

Signification et utilisation

4. S'agissant des substances organiques inertes, une relation très significative a été mise en évidence entre leur coefficient de partage 1-octanol/eau (P_{OE}) et leur bioaccumulation dans les poissons. De plus, une corrélation entre le P_{OE} et, d'une part, la toxicité pour les poissons et, d'autre part, la sorption de produits chimiques sur des solides tels que les sols et les sédiments, a également été démontrée. La référence (6) livre un large aperçu de ces relations.

5. Des relations très diverses entre le coefficient de partage 1-octanol/eau et d'autres propriétés des substances intéressant la chimie et la toxicologie environnementales ont été établies. Le coefficient de partage 1-octanol/eau est ainsi devenu un paramètre fondamental dans l'évaluation des risques des substances chimiques pour l'environnement et dans la prédiction du devenir de ces substances dans l'environnement.

Champ d'application

6. La méthode du brassage lent est censée réduire la formation de micro-gouttelettes de 1-octanol dans la phase aqueuse, ce qui écarte le problème de la surestimation de la concentration en phase aqueuse due à la présence de molécules de la substance d'essai dans ces gouttelettes. Par conséquent, la méthode du brassage lent convient particulièrement à la détermination du P_{OE} de substances dont le log P_{OE} est supposément supérieur ou égal à 5, gamme dans laquelle la méthode par agitation en flacon (2) tend à fournir des résultats fausséss.

▼M4

DÉFINITION ET UNITÉS

7. Le coefficient de partage d'une substance entre l'eau et un solvant lipophile (1-octanol) caractérise la répartition à l'équilibre de la substance chimique entre les deux phases. Le coefficient de partage entre l'eau et le 1-octanol (P_{OE}) est défini comme étant le rapport des concentrations à l'équilibre de la substance d'essai dans du 1-octanol saturé avec de l'eau (C_O) et dans de l'eau saturée avec du 1-octanol (C_E).

$$P_{OE} = C_O/C_E$$

Le rapport de deux concentrations est une valeur adimensionnelle. Il est exprimé le plus souvent par son logarithme décimal (log P_{OE}). Le P_{OE} dépend de la température et les résultats rapportés doivent préciser la température de mesure.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

8. En vue de déterminer le coefficient de partage, on laisse le système formé par l'eau, le 1-octanol et la substance d'essai s'équilibrer à température constante. Ensuite, on mesure les concentrations de la substance d'essai dans les deux phases.

9. La méthode du brassage lent, proposée ici, permet de réduire les difficultés expérimentales associées à la formation de micro-gouttelettes dans la méthode par agitation en flacon. Avec le brassage lent, l'eau, le 1-octanol et la substance d'essai s'équilibrent dans un réacteur thermostaté soumis à une agitation douce. Les échanges entre les phases sont accélérés par le brassage. Ce dernier produit une légère turbulence qui favorise les échanges entre le 1-octanol et l'eau sans provoquer la formation de gouttelettes (1).

APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

10. La présence de substances autres que la substance d'essai risquant d'influencer le coefficient d'activité de la substance d'essai, celle-ci doit être testée à l'état pur. Il convient d'employer une substance d'essai présentant le degré de pureté le plus élevé que l'on puisse trouver dans le commerce.

11. Cette méthode s'applique aux substances pures qui ne se dissocient ni s'associent et qui ne manifestent aucune activité interfaciale sensible. Cette méthode convient également aux mélanges. Le cas échéant, les coefficients de partage 1-octanol/eau déterminés varient en fonction de la composition chimique du mélange testé et de la composition électrolytique employée comme phase aqueuse. À condition de prendre certaines mesures supplémentaires, cette méthode peut aussi s'appliquer à des substances qui se dissocient ou s'associent (paragraphe 12).

12. Le partage des substances sujettes à la dissociation, telles que les acides organiques et les phénols, les bases organiques et les composés organométalliques, entre l'eau et le 1-octanol comportant de multiples équilibres dans ces phases, le P_{OE} est une constante conditionnelle qui dépend fortement de la composition électrolytique (7) (8). D'où la nécessité de contrôler le pH et la composition électrolytique lors de la détermination du P_{OE} et de rapporter les valeurs de ces deux paramètres. L'évaluation de ces coefficients de partage doit être confiée à un expert. Il convient de sélectionner des valeurs de pH appropriées d'après la valeur de la ou des constantes de dissociation, afin d'établir un coefficient de partage pour chaque état d'ionisation. Les composés organométalliques doivent être testés à l'aide de tampons non complexants (8). À la lumière des connaissances actuelles en matière de chimie en phase aqueuse (constantes de complexation et de dissociation), on choisira des conditions expérimentales permettant d'estimer la formation d'espèces par la substance d'essai en phase aqueuse. Il faut instaurer une force ionique identique dans toutes les expériences en employant un électrolyte de fond.

▼M4

13. Les substances peu solubles dans l'eau ou présentant un P_{OE} élevé peuvent engendrer des problèmes dus au fait que leurs concentrations dans l'eau sont si faibles qu'il devient difficile de les déterminer avec exactitude. La présente méthode d'essai livre des indications sur la manière de traiter ce problème.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

14. Le degré de pureté des réactifs chimiques doit au moins correspondre à celui de la qualité pour analyse. Il est recommandé d'utiliser des substances d'essai non marquées de composition chimique connue et d'une pureté d'au moins 99 % ou des substances d'essai radiomarquées de composition chimique et pureté radiochimique connues. S'il s'agit de traceurs à demi-vie courte, on appliquera des corrections pour tenir compte de la désintégration. Si la substance d'essai est radiomarquée, il y a lieu d'employer une méthode analytique spécifique à la substance de telle sorte que la radioactivité mesurée se rapporte directement à la substance d'essai.

15. Il est possible d'estimer le log P_{OE} avec les logiciels vendus dans le commerce à cet effet, ou en s'appuyant sur le rapport des solubilités dans les deux solvants.

16. Avant de déterminer le P_{OE} par la méthode du brassage lent, il faut disposer des informations suivantes sur la substance d'essai:

a) formule structurale;

b) méthodes analytiques appropriées à la détermination de la concentration de la substance dans l'eau et dans le 1-octanol;

c) constante(s) de dissociation des substances ionisables [ligne directrice 112 de l'OCDE (9)];

d) solubilité dans l'eau (10);

e) hydrolyse abiotique (11);

f) biodégradabilité immédiate (12);

g) pression de vapeur (13).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Matériel et appareillage

17. Cette expérience nécessite du matériel courant de laboratoire, et en particulier:

— des agitateurs magnétiques et des barres d'agitation magnétiques recouvertes de Teflon pour agiter la phase aqueuse,

— des instruments d'analyse permettant de déterminer la concentration de la substance d'essai aux concentrations attendues,

— une bouteille à agiter munie d'un robinet à sa base. Suivant l'estimation du log P_{OE} et le seuil de détection de la substance d'essai, on envisagera d'utiliser un réacteur d'un volume supérieur à un litre, de la même géométrie, de manière à obtenir un volume d'eau suffisant pour l'extraction et l'analyse chimiques de la substance d'essai. La concentration de la substance d'essai dans l'extrait aqueux sera donc plus élevée, ce qui rendra la détermination analytique plus fiable. Un tableau reproduisant des estimations du volume minimal requis, le seuil de détection de la substance, l'estimation de son log P_{OE} et de sa solubilité dans l'eau figure en appendice 1. Ce tableau se fonde sur la relation entre le log P_{OE} et le rapport des solubilités dans l'octanol et dans l'eau, telle que présentée par Pinsuwan *et al.* (14):

$$\log P_{OE} = 0{,}88 \log SR + 0{,}41$$

▼M4

avec

$SR = S_{oct}/S_{eau}$ (en molarité),

et sur la relation donnée par Lyman (15) pour prédire la solubilité dans l'eau. Les solubilités dans l'eau calculées avec l'équation donnée à l'appendice 1 sont à considérer comme une première estimation. Notons que l'utilisateur est libre d'estimer la solubilité dans l'eau à l'aide de n'importe quelle autre relation jugée mieux représenter la relation entre l'hydrophobie et la solubilité. S'agissant des substances solides, l'inclusion du point de fusion dans la prédiction de la solubilité est par exemple recommandée. Si l'on utilise une équation modifiée, il faut vérifier que l'équation permettant de calculer la solubilité dans l'octanol est toujours valable. Une bouteille à agiter recouverte d'une enveloppe de verre et d'une capacité d'environ un litre est schématisée en appendice 2. Les proportions de la bouteille représentée en appendice 2 se sont avérées propices et doivent être conservées si la dimension de l'appareil est modifiée,

— il est essentiel de maintenir la température constante durant le brassage lent, à l'aide d'un dispositif adéquat.

18. Les récipients doivent être composés d'un matériau inerte rendant négligeable l'adsorption à la surface des récipients.

Préparation des solutions expérimentales

19. La détermination du P_{OE} requiert un 1-octanol de la qualité la plus pure qui puisse se trouver dans le commerce (au moins 99 %). Il est recommandé de purifier le 1-octanol par une extraction réalisée avec un acide, une base et de l'eau, suivie d'un séchage. Le 1-octanol peut, en plus, être purifié par distillation. Les solutions étalons des substances d'essai doivent être préparées avec du 1-octanol purifié. L'eau destinée à la détermination du P_{OE} doit être distillée à l'aide d'un dispositif en verre ou en quartz, ou traitée par un système de purification, ou encore être de qualité HPLC. Il convient de filtrer l'eau distillée à travers des mailles de 0,22 μm et d'inclure des blancs afin de s'assurer que les extraits concentrés ne renferment pas d'impuretés susceptibles d'interférer avec la substance d'essai. Si l'on emploie un filtre en fibres de verre, il faut le nettoyer en le laissant au moins trois heures dans un four à 400 °C.

20. Afin de saturer chaque solvant par l'autre avant l'expérience, on les équilibre dans un récipient suffisamment grand. Pour ce faire, le système à deux phases est soumis à un brassage lent durant deux jours.

21. Une concentration appropriée de la substance d'essai est choisie et dissoute dans du 1-octanol (saturé avec de l'eau). Il y a lieu de déterminer le coefficient de partage 1-octanol/eau dans des solutions diluées dans du 1-octanol et de l'eau. Aussi la concentration de la substance d'essai ne doit-elle pas excéder 70 % de sa solubilité avec une concentration maximale de 0,1 M dans chaque phase (1). Les solutions de 1-octanol utilisées pour l'expérience seront exemptes de substance d'essai en suspension à l'état solide.

22. La quantité appropriée de substance d'essai est dissoute dans du 1-octanol (saturé avec de l'eau). Si l'estimation du log P_{OE} est supérieure à 5, il faut s'assurer que les solutions de 1-octanol utilisées pour l'expérience ne renferment pas de substance d'essai en suspension à l'état solide. À cette fin, la procédure suivante est appliquée pour les substances chimiques dont la valeur estimée de log $P_{OE} > 5$:

— la substance d'essai est dissoute dans du 1-octanol (saturé avec de l'eau),

▼M4

— on laisse reposer la solution suffisamment longtemps pour que la substance suspendue à l'état solide se dépose. Durant la décantation, la concentration de la substance d'essai est mesurée en continu,

— une fois que les concentrations mesurées dans la solution de 1-octanol ont atteint une valeur stable, la solution mère est diluée avec un volume approprié de 1-octanol,

— la concentration de la solution mère diluée est mesurée. Si la concentration mesurée concorde avec la dilution, la solution mère diluée peut être utilisée dans le processus expérimental du brassage lent.

Extraction et analyse des échantillons

23. Le dosage de la substance d'essai s'effectue par une méthode analytique validée. Les chercheurs doivent prouver que, durant l'essai, les concentrations dans le 1-octanol saturé avec de l'eau et dans la phase aqueuse saturée avec du 1-octanol sont supérieures au seuil de quantification du procédé analytique employé. Il y a lieu d'établir avant l'essai le taux de récupération par l'analyse de la substance d'essai en phase aqueuse et en phase 1-octanol, dans les cas où des méthodes d'extraction s'avèrent nécessaires. Le signal analytique doit être corrigé en fonction des blancs et l'on veillera à éviter tout transfert de la substance à analyser d'un échantillon à l'autre.

24. Les concentrations des substances d'essai hydrophobes étant plutôt faibles en phase aqueuse, il faudra probablement extraire la substance de la phase aqueuse à l'aide d'un solvant organique et préconcentrer l'extrait avant analyse. Pour la même raison, il est nécessaire de réduire les éventuelles concentrations du blanc. À cette fin, on emploie des solvants très purs, de préférence des solvants pour l'analyse des résidus. En outre, un nettoyage soigneux (par exemple lavage au solvant ou cuisson à haute température) de la verrerie avant l'expérience peut diminuer le risque de contamination croisée.

25. Il est possible d'estimer le log P_{OE} à l'aide d'un programme d'estimation ou en faisant appel à un expert. Si sa valeur est supérieure à six, d'une part il convient d'être très attentif aux corrections en fonction du blanc et à tout transfert de la substance à analyser d'un échantillon à l'autre et, d'autre part, il est impératif d'utiliser un étalon de substitution pour corriger le taux de récupération, de façon à pouvoir atteindre des facteurs de préconcentration élevés. Plusieurs logiciels d'estimation du log P_{OE} se trouvent dans le commerce ([1]), par exemple Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) et ACD logP (19). Les références (20-22) décrivent les différents procédés d'estimation.

26. Les seuils de quantification pour la détermination de la substance d'essai dans le 1-octanol et dans l'eau sont établis suivant des méthodes acceptées. Comme principe de base, le seuil de quantification de la méthode employée peut être considéré comme étant la concentration dans l'eau ou le 1-octanol qui produit un rapport signal/bruit de dix. Il convient de choisir des méthodes d'extraction et de préconcentration appropriées et de spécifier le taux de récupération de l'analyse. Le facteur de préconcentration doit être choisi de façon à produire un signal de l'intensité requise lors de la détermination analytique.

([1]) Cette information n'est fournie qu'à titre indicatif. D'autres logiciels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils produisent les mêmes résultats.

▼M4

27. En fonction des paramètres de la méthode analytique et des concentrations escomptées, on détermine le volume de l'échantillon qui permettra de déterminer avec exactitude la concentration de la substance d'essai. L'utilisation d'échantillons aqueux trop petits pour obtenir un signal analytique suffisant est à éviter. Les échantillons aqueux ne doivent pas non plus être trop grands, car le volume d'eau restant risquerait d'être insuffisant pour le nombre minimal d'analyses requises (n = 5). L'appendice 1 indique les volumes minimaux des échantillons en fonction du volume du récipient, du seuil de détection de la substance d'essai et de sa solubilité.

28. La quantification des substances d'essai s'effectue par comparaison avec les courbes d'étalonnage des substances d'essai. Les concentrations des étalons doivent figurer entre parenthèses à côté des concentrations relevées dans les échantillons analysées.

29. Pour les substances d'essai dont le log P_{OE} estimé est supérieur à six, on verse un étalon de substitution dans l'échantillon aqueux avant l'extraction afin de relever les pertes survenues durant l'extraction et la préconcentration des échantillons aqueux. Pour que la correction du taux de récupération soit correcte, les étalons de substitution doivent avoir des propriétés très semblables ou identiques à celles de la substance d'essai. À cette fin, on utilise de préférence des analogues isotopiques (stables) marqués de la substance d'essai (perdeutériés ou marqués au ^{13}C, par exemple). Si l'utilisation d'un isotope marqué stable, c'est-à-dire marqué au ^{13}C ou au ^{2}H, est impossible, il faut démontrer, en s'appuyant sur des données fiables tirées de publications, que les propriétés physico-chimiques de l'étalon de substitution sont très proches de celles de la substance d'essai. Des émulsions peuvent se former au cours de l'extraction liquide-liquide de la phase aqueuse. Pour réduire ce phénomène, on peut ajouter du sel et laisser reposer l'émulsion toute une nuit. Les méthodes utilisées pour extraire et préconcentrer les échantillons doivent être mentionnées.

30. Les échantillons prélevés dans la phase 1-octanol peuvent, si nécessaire, être dilués avec un solvant adéquat avant l'analyse. De plus, l'utilisation d'étalons de substitution pour corriger la récupération est recommandée pour les substances qui se sont avérées présenter un degré de variation élevé lors des essais de récupération (écart-type relatif supérieur à 10 %).

31. Les détails de la méthode analytique devront figurer dans le rapport. Ceux-ci incluent la méthode d'extraction, les facteurs de préconcentration et de dilution, les paramètres des instruments, le processus d'étalonnage, la gamme d'étalonnage, la récupération de la substance d'essai présente dans l'eau par un procédé analytique, l'ajout d'étalons de substitution pour corriger le taux de récupération, les valeurs des blancs, les seuils de détection et les seuils de quantification.

Déroulement de l'essai

Rapports volumiques 1-octanol/eau optimaux

32. Les volumes d'eau et de 1-octanol sont choisis en fonction du seuil de quantification dans le 1-octanol et dans l'eau, des facteurs de préconcentration appliqués aux échantillons aqueux, des volumes prélevés dans le 1-octanol et dans l'eau et des concentrations prévues. Pour des raisons expérimentales, le volume de 1-octanol employé dans le système de brassage lent doit être choisi de telle sorte que la couche de 1-octanol soit suffisamment épaisse (> 0,5 cm) pour qu'un prélèvement puisse s'effectuer dans la phase 1-octanol sans la perturber.

33. Les rapports volumiques utilisés couramment pour analyser des substances dont le log P_{OE} est supérieur ou égal à 4,5 sont de 20 à 50 ml de 1-octanol et de 950 à 980 ml d'eau dans un récipient d'un litre.

▼**M4**

Conditions expérimentales

34. Durant l'essai, le réacteur est thermostaté de manière à limiter la variation de température à moins de 1 °C. L'essai doit être conduit à 25 °C.

35. On protège le système expérimental de la lumière du jour en effectuant l'essai dans une pièce obscure ou en recouvrant le réacteur d'une feuille d'aluminium.

36. L'essai doit être mené dans un environnement aussi dépoussiéré que possible.

37. Le système 1-octanol/eau est agité jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint. Le temps requis pour atteindre l'équilibre est évalué au moyen d'un essai pilote de brassage lent au cours duquel on prélève de l'eau et de l'octanol périodiquement. Les temps de prélèvement doivent être espacés d'au moins cinq heures.

38. Chaque détermination du P_{OE} doit s'effectuer sur la base d'au moins trois essais de brassage lent indépendants.

Détermination du temps requis pour parvenir à l'équilibre

39. On admet que l'équilibre est atteint lorsque la régression du rapport des concentrations dans le 1-octanol et dans l'eau en fonction du temps (la variable temps comprenant quatre point s) se traduit par une pente ne s'écartant pas de manière significative de zéro pour une valeur de p égale à 0,05. Le temps minimal requis pour atteindre l'équilibre avant de pouvoir commencer les prélèvements est d'un jour. En principe, le prélèvement des substances dont le log P_{OE} estimé est inférieur à cinq peut s'effectuer au cours des deuxième et troisième jours. Il est possible que le temps pour parvenir à l'équilibre soit plus long pour les substances plus hydrophobes. Pour une substance ayant un log P_{OE} égal à 8,23 (décachlorobiphényle), 144 heures ont été suffisantes pour atteindre l'équilibre. L'équilibre est évalué par une série de prélèvements effectués dans le même récipient.

Début de l'essai

40. On commence par remplir le réacteur avec de l'eau saturée en 1-octanol. Ensuite, on attend que le système atteigne la température requise par le thermostat.

41. La quantité voulue de substance d'essai (dissoute dans le volume requis de 1-octanol saturé en eau) est ajoutée soigneusement au réacteur. Il s'agit d'une étape critique de l'essai car il faut éviter le mélange turbulent des deux phases. À cette fin, la phase 1-octanol peut être versée doucement à l'aide d'une pipette sur la paroi du récipient d'essai, à proximité de la surface de l'eau. Elle ruissellera ainsi le long de la paroi et formera un film au dessus de la phase aqueuse. Il faut toujours éviter de décanter le 1-octanol directement dans la bouteille; on ne peut pas faire tomber des gouttes de 1-octanol directement dans l'eau.

42. Une fois l'agitation lancée, on augmente lentement sa vitesse. Si les moteurs de l'agitateur ne peuvent être réglés correctement, on envisagera d'utiliser un transformateur. La vitesse d'agitation doit être réglée de manière à créer un vortex à l'interface entre l'eau et le 1-octanol d'une profondeur de 0,5 à 2,5 cm au maximum. Il faut diminuer la vitesse d'agitation si la profondeur du vortex dépasse 2,5 cm, sinon des micro-gouttelettes de 1-octanol peuvent se former dans la phase aqueuse et donner lieu à une surestimation de la concentration de la substance d'essai dans l'eau. D'après les résultats d'un essai tournant de validation (5), on recommande d'appliquer une vitesse maximale d'agitation de 2,5 cm. Elle représente un compromis permettant de parvenir rapidement à l'équilibre tout en limitant la formation de microgouttelettes de 1-octanol.

▼**M4**

Prélèvement et traitement des échantillons

43. Il convient d'arrêter l'agitateur avant d'effectuer les prélèvements et d'attendre que les liquides s'immobilisent. Lorsque le prélèvement est terminé, l'agitateur est remis en marche doucement, comme décrit plus haut; après quoi on augmente la vitesse d'agitation progressivement.

44. La phase aqueuse est prélevée à un robinet situé à la base du réacteur. Il faut toujours éliminer le volume mort d'eau contenu dans les robinets (environ 5 ml pour le récipient illustré à l'appendice 2). L'eau retenue dans les robinets n'est pas agitée et donc pas en équilibre avec l'ensemble. On note le volume des échantillons aqueux et on vérifie que la quantité de substance d'essai présente dans l'eau éliminée est prise en compte dans l'établissement du bilan massique. Il y a lieu de réduire au minimum les pertes par évaporation en permettant à l'eau de s'écouler doucement dans l'entonnoir séparateur de façon à ne pas perturber la couche eau/1-octanol.

45. On prélève les échantillons de 1-octanol en aspirant une petite aliquote (environ 100 µl) de la couche 1-octanol au moyen d'une seringue de 100 microlitres en verre et métal. Il faut veiller à ne pas perturber l'interface. Le volume de liquide prélevé est consigné. Une petite aliquote suffit, étant donné que l'échantillon de 1-octanol sera dilué.

46. Les étapes inutiles de transfert d'échantillons sont à éviter. Aussi le volume des échantillons est-il déterminé par gravimétrie. Dans le cas des échantillons aqueux, cette détermination s'effectue par la collecte de l'échantillon aqueux dans un entonnoir séparateur contenant déjà le volume de solvant requis.

RÉSULTATS ET RAPPORT

47. La méthode d'essai prescrit de déterminer le P_{OE} en conduisant trois essais à brassage lent (trois unités expérimentales) dans des conditions expérimentales identiques. La régression utilisée pour démontrer que l'équilibre a été atteint doit s'appuyer sur les résultats d'au moins quatre déterminations du rapport C_O/C_E effectuées à quatre moments ponctuels successifs. La variance ainsi calculée correspond à une mesure de l'incertitude de la valeur moyenne obtenue pour chaque unité expérimentale.

48. Le P_{OE} peut être caractérisé par la variance des données recueillies pour chaque unité expérimentale. Cette information est employée pour calculer le P_{OE} en considérant qu'il équivaut à la moyenne pondérée des résultats de chaque unité expérimentale. Pour ce faire, l'inverse de la variance des résultats des unités expérimentales est employé comme coefficient pondérateur. Ainsi, les données accusant une forte variation (exprimée par la variance), qui sont donc moins fiables, ont moins d'influence sur le résultat que les données offrant une variance faible.

49. L'écart-type pondéré est calculé d'une manière analogue. Il caractérise la répétabilité de la mesure du P_{OE}. Un écart-type pondéré faible traduit une répétabilité élevée de la détermination du P_{OE} au sein d'un même laboratoire. Le traitement statistique formel des données est résumé ci-dessous.

▼M4

Traitement des résultats

Démonstration de la réalisation de l'équilibre

50. Le logarithme du rapport des concentrations de la substance d'essai dans le 1-octanol et dans l'eau (log C_O/C_E) est calculé pour chaque instant de prélèvement. On démontre que l'équilibre chimique est atteint en traçant une courbe de ce rapport en fonction du temps. L'apparition d'un plateau sur ce tracé, établi à partir d'au moins quatre points consécutifs sur l'axe du temps, indique que l'équilibre a été atteint et que le composé est complètement dissous dans le 1-octanol. Dans le cas contraire, il faut poursuivre l'essai jusqu'à ce que quatre points de temps successifs présentent une pente qui n'est pas significativement différente de zéro, pour une valeur de p = 0,05, montrant ainsi que le log C_O/C_E est indépendant du temps.

Calcul du log P_{OE}

51. La valeur du log P_{OE} de l'unité expérimentale correspond à la moyenne pondérée du log C_O/C_E pour la partie de la courbe du log C_O/C_E en fonction du temps, pour laquelle l'état d'équilibre a été démontré. On calcule la moyenne pondérée en pondérant les données avec l'inverse de la variance de telle sorte que l'influence des données sur le résultat final est inversement proportionnelle à l'incertitude des données.

Moyenne des log P_{OE}

52. La valeur moyenne du log P_{OE} de différentes unités expérimentales correspond à la moyenne des résultats de chaque unité expérimentale pondérés avec leurs variances respectives.

Le calcul répond à la formule suivante:

$$\log P_{OE,moy} = (\Sigma w_i \times \log P_{OE,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

où:

$\log P_{OE,i}$ = est la valeur du log P_{OE} de chaque unité expérimentale i;

$\log P_{OE\ moy}$ = est la moyenne pondérée de tous les log P_{OE};

w_i = est le poids statistique attribué à la valeur log P_{OE} de l'unité expérimentale i.

L'inverse de la variance de log\;$P_{OE,i}$ est représentée par w_i ($w_i = \text{var}(\log\ P_{OE,i})^{-1}$).

53. L'estimation de l'erreur de la moyenne de log P_{OE} correspond à la répétabilité des log C_O/C_E déterminés durant la phase d'équilibre dans chaque unité expérimentale. Elle se traduit par l'écart-type pondéré du log $P_{OE\ moy}$ ($\sigma_{\log\ Poe\ moy}$) qui mesure l'erreur associée au log $P_{OE\ moy}$. L'écart-type pondéré peut être calculé à partir de la variance pondérée ($\text{var}_{\log\ Poe\ moy}$) de la façon suivante:

$$\text{var}_{\log Poe,moy} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OE,i} - \log P_{OE,moy})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Poe,moy} = (\text{var}_{\log Poe,moy})^{0,5}$$

où n représente le nombre d'unités expérimentales.

▼**M4**

Rapport d'essai

54. Le rapport d'essai doit mentionner les informations suivantes:

Substance d'essai:

— nom courant, nom chimique, numéro CAS, formule structurale (montrant la position du radiomarqueur, le cas échéant) et propriétés physico-chimiques pertinentes (voir paragraphe 17),

— pureté (impuretés) de la substance d'essai,

— pureté radiochimique des substances marquées et activité molaire (s'il y a lieu),

— estimation préliminaire du log P_{OE} et méthode utilisée pour ce calcul.

Conditions expérimentales:

— dates de la réalisation des études,

— température à laquelle s'est déroulé l'essai,

— volumes de 1-octanol et d'eau au début de l'essai,

— volumes des échantillons de 1-octanol et d'eau prélevés,

— volumes de 1-octanol et d'eau restant dans les récipients expérimentaux;

— description des récipients expérimentaux et des conditions d'agitation utilisées (géométrie de la barre d'agitation et du récipient expérimental, hauteur du vortex en mm et vitesse d'agitation si elle est connue),

— méthodes analytiques utilisées pour déterminer la substance d'essai et seuil de quantification de la méthode,

— heures de prélèvement,

— pH de la phase aqueuse et tampons utilisés, lorsqu'on a ajusté le pH pour des molécules ionisables,

— nombre d'expériences identiques.

Résultats:

— répétabilité et sensibilité des méthodes analytiques employées,

— concentrations de la substance d'essai déterminées dans le 1-octanol et dans l'eau en fonction du temps,

— démonstration du bilan massique,

— température et écart-type ou gamme de températures appliquée durant l'essai,

— régression du rapport des concentrations en fonction du temps,

— valeur moyenne de $P_{OE\ moy}$ et son écart-type,

— analyse et interprétation des résultats,

▼**M4**

— exemples de données brutes d'une analyse représentative (toutes les données brutes doivent être conservées conformément aux bonnes pratiques de laboratoire), notamment le taux de récupération des produits de substitution, le nombre de niveaux appliqué à l'étalonnage (ainsi que les critères régissant le coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage) et résultats de l'assurance qualité/contrôle qualité (AQ/CQ),

— s'il est disponible: rapport de validation du protocole expérimental (à mentionner parmi les références).

BIBLIOGRAPHIE:

(1) De Bruijn J.H.M., Busser F., Seinen W., Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the «slow-stirring» method. *Environ. Toxicol. Chem.* 8: 499-512.

(2) Chapitre A.8 de la présente annexe, Coefficient de partition.

(3) Chapter A.8 de la présente annexe, Coefficient de partition.

(4) OCDE (2000). Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques: 122 – Coefficient de partition (n-octanol/eau): méthode par pH-métrie pour les substances ionisables. Paris.

(5) Tolls J. (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

(6) Boethling R.S., Mackay D. (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

(7) Schwarzenbach R.P., Gschwend P.M., Imboden D.M. (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

(8) Arnold C.G., Widenhaupt A., David M.M., Müller S.R., Haderlein S.B., Schwarzenbach R.P. (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596-2602.

(9) OCDE (1981) Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques: 112 – Constantes de dissociation dans l'eau. Paris.

(10) Chapitre A.6 de la présente annexe, Solubilité dans l'eau.

(11) Chapitre C.7 de la présente annexe, Dégradation – Dégradation abiotique: hydrolyse en fonction du pH.

(12) Chapitre C.4 – Parties II à VII (Méthode A à F) de la présente annexe, Détermination de la biodégradabilité immédiate.

(13) Chapitre A.4 de la présente annexe, Pression de vapeur.

(14) Pinsuwan S., Li A. and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623-626.

(15) Lyman W.J. (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H., Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 to 2-52.

(16) Leo A., Weininger D. (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

(17) Meylan W. (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

(18) Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.

(19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼**M4**

(20) Lyman W.J. (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H., eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, DC.

(21) Rekker R.F., de Kort H.M. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479-488.

(22) Jübermann O. (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.

▼M4

Appendice 1

Tables permettant de calculer les volumes d'eau minimaux requis pour détecter des substances d'essai ayant différentes valeurs de log P_{OE} en phase aqueuse

Hypothèses:

— Volume maximal de chaque aliquote = 10 % du volume total; 5 aliquotes = 50 % du volume total.

— Concentration des substances d'essai = 0,7 × solubilité dans chaque phase. Si les concentrations sont inférieures, il faudra utiliser de plus grands volumes.

— Volume utilisé pour la détermination du seuil de détection = 100 ml.

— Log P_{OE} en fonction du log S_E et le log P_{OE} en fonction de SR (S_{oct}/S_e) sont des représentations raisonnables de relations pour les substances d'essai.

Estimation de S_e

log P_{OE}	équation	log S_e	S_e (mg/l)
4	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	0,035	1,084E+00
5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–0,426	3,750E-01
5,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–0,887	1,297E-01
6	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–1,348	4,487E-02
6,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–1,809	1,552E-02
7	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–2,270	5,370E-03
7,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–2,731	1,858E-03
8	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–3,192	6,427E-04

Estimation de S_{oct}

log P_{OE}	équation	S_{oct} (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}49$	2,710E+05

▼**M4**

Masse totale de la substance d'essai (mg)	$Masse_{oct}/Masse_{eau}$	$Masse_{H2O}$ (mg)	$Conc_{H2O}$ (mg/l)	$Masse_{oct}$ (mg)	$Conc_{oct}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Calcul des volumes

Volume minimal requis pour la phase H_2O à chaque concentration du seuil de détection

$\log K_{OE}$	Seuil de détection (microgrammes/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Volume utilisé pour le seuil de détection (L)	0,1					

Légende pour les calculs

Représente < 10 % du volume total de la phase aqueuse, récipient d'équilibrage de 1 litre.

Représente < 10 % du volume total de la phase aqueuse, récipient d'équilibrage de 2 litres.

Représente < 10 % du volume total de la phase aqueuse, récipient d'équilibrage de 5 litres.

Représente < 10 % du volume total de la phase aqueuse, récipient d'équilibrage de 10 litres.

Dépasse 10 % y compris du récipient d'équilibrage de 10 litres.

▼M4

Vue d'ensemble des volumes requis en fonction de la solubilité dans l'eau et du log P_{OE}

Volume minimal requis pour la phase H_2O à chaque concentration du seuil de détection (ml)

log P_{OE}	S_e (mg/l)	Seuil de détection (microgrammes/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

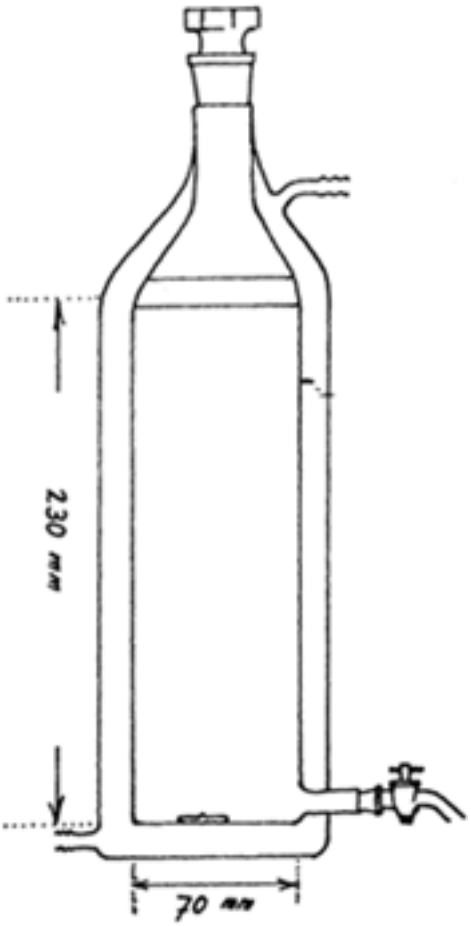
▼**M4**

log P_{OE}	S_e (mg/l)	Seuil de détection (microgrammes/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Volume utilisé pour le seuil de détection (L)		0,1					

▼M4

Appendice 2

Exemple de récipient expérimental à enveloppe de verre destiné à la détermination du P_{OE} par la méthode du brassage lent



▼M6

A.24. COEFFICIENT DE PARTAGE (N-OCTANOL/EAU), MÉTHODE HPLC (CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE)

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 117 (2004) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.

1. Le coefficient de partage (P) est le rapport des concentrations d'équilibre d'une substance dissoute dans un système à deux phases composé de deux solvants largement non miscibles. Dans le cas du n-octanol et de l'eau:

$$P_{oe} = \frac{C_n - \text{octanol}}{C_{\text{eau}}}$$

Étant le quotient de deux concentrations, le coefficient de partage est sans dimension et il est généralement donné sous la forme de son logarithme en base dix.

2. P_{oe} est un paramètre clé des études du devenir des substances chimiques dans l'environnement. On a mis en évidence l'existence d'une relation hautement significative entre le P_{oe} de substances sous forme non ionisées et leur bio-accumulation dans les poissons. De même, il a été démontré que le P_{oe} était un paramètre utile pour prédire l'adsorption sur les sols et sédiments, mais aussi pour établir une relation structure-activité quantitative pour un large éventail d'effets biologiques.

3. La proposition originale de la présente méthode d'essai est basée sur un article de C.V. Eadsforth et P. Moser (1). L'élaboration de la méthode d'essai et la conduite d'un essai comparatif inter-laboratoires à l'échelle de l'OCDE ont été coordonnées par le Umweltbundesamt de la République fédérale d'Allemagne au cours de l'année 1986 (2).

CONSIDÉRATIONS INITIALES

4. La méthode par agitation en flacon (Shake-Flask) permet de déterminer de manière expérimentale les valeurs log P_{oe} dans la plage – 2 à 4 (et à l'occasion jusqu'à 5 et plus) ([1]) (Chapitre A.8 de la présente annexe, ligne directrice 107 de l'OCDE). La méthode HPLC couvre le log P_{oe} dans la plage de 0 à 6 (1)(2)(3)(4)(5). Le cas échéant, cette méthode peut nécessiter une estimation de P_{oe} de façon à attribuer des substances de référence appropriées, mais aussi appuyer les conclusions éventuellement tirées des résultats de cet essai. Les méthodes de calcul sont succinctement abordées dans l'appendice de la présente méthode d'essai. Le mode opératoire HPLC est isocratique.

5. Les valeurs de P_{oe} dépendant des conditions environnementales (température, pH, force ionique, etc.), il convient de définir ces dernières dans l'expérience pour que les résultats P_{oe} soient ensuite correctement interprétés. Pour les substances ionisables, une autre méthode (par exemple, celle décrite dans le projet de ligne directrice de l'OCDE relative à une méthode pHmétrique pour les substances ionisables) pourrait devenir disponible et être utilisée en remplacement (6). Cela étant, si ce projet de ligne directrice de l'OCDE peut convenir pour déterminer le P_{oe} des substances ionisables, il est néanmoins préférable de recourir dans certains cas à la méthode HPLC à un pH pertinent du point de vue de l'environnement (voir le paragraphe 9).

([1]) L'application d'une limite supérieure est imposée par la nécessité de réaliser une phase de séparation complète après ajustements de l'équilibre de partition et avant prélèvement des échantillons pour détermination analytique. En apportant un soin particulier à l'opération, on peut porter la limite supérieure à des valeurs supérieures de P_{oe}.

▼**M6**

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

6. La HPLC phase inverse est effectuée sur des colonnes analytiques remplies de phase silice (achetée dans le commerce) greffée avec de longues chaînes hydrocarbonées (C_8 ou C_{18}, par exemple).

7. Une substance chimique injectée sur une telle colonne se partage entre la phase mobile du solvant et la phase stationnaire hydrocarbonée, et elle est transportée le long de la colonne par la phase mobile. Les substances sont retenues en proportion de leur coefficient de partage hydrocarbone-eau, les substances hydrophiles étant éluées les premières et les substances lipophiles les dernières. Le temps de rétention est décrit par le facteur de capacité k, donné par l'expression suivante:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

où t_R est le temps de rétention de la substance d'essai, et t_0 le temps mort, c'est-à-dire le temps moyen nécessaire à une molécule du solvant pour passer la colonne Aucune méthode analytique quantitative n'est requise et seule la détermination des temps de rétention est nécessaire.

8. Le coefficient de partage octanol/eau d'une substance d'essai peut être calculé de manière expérimentale, en déterminant tout d'abord son facteur de capacité k que l'on intègre ensuite dans l'équation suivante:

$$\log P_{oe} = a + b \times \log\ k$$

où

a, b = coefficients de régression linéaire.

L'équation ci-avant peut être obtenue par régression linéaire logarithmique des coefficients de partage octanol/eau des substances de référence par rapport au logarithme des facteurs de capacité de ces mêmes substances.

9. La méthode de la HPLC phase inverse permet d'estimer les coefficients de partage dans une plage de log P_{oe} allant de 0 à 6, mais cette plage peut être étendue (de 6 à 10) dans certains cas exceptionnels. Dans ces derniers cas, la phase mobile est modifiée (3). Cette méthode n'est pas applicable aux bases et acides forts, aux complexes métalliques, aux substances réagissant avec l'éluant, ou aux agents tensio-actifs. Des mesures peuvent être effectuées sur des substances ionisables sous leur forme non ionisée (acide ou base libre), mais uniquement en utilisant un tampon avec un pH inférieur au pK_a pour un acide libre, ou supérieur au pK_a pour une base libre. Il se peut que la méthode pHmétrique devienne disponible et elle pourrait aussi être utilisée en remplacement pour les substances ionisables (6). Si la valeur log P_{oe} est déterminée en vue d'une classification des dangers environnementaux ou d'une évaluation des risques pour l'environnement, l'essai doit être conduit dans la plage de pH pertinente pour l'environnement naturel, c'est-à-dire pour des pH de 5 à 9.

10. Dans certains cas, des impuretés peuvent compliquer l'interprétation des résultats, du fait des incertitudes dans l'affectation des pics. Pour les mélanges dont le résultat comporte une bande non résolue, les limites supérieure et inférieure de log P_{oe}, ainsi que le pourcentage de surface de chaque pic de log P_{oe} doivent être indiqués. Pour les mélanges constitués d'un groupe d'homologues, la moyenne pondérée log P_{oe} doit également être précisée (7), et calculée sur la base des valeurs P_{oe} individuelles et des pourcentages de surface correspondants (8). Tous les pics contribuant à une surface de 5 pour cent ou plus de la surface totale de tous les pics doivent être pris en compte dans le calcul (9):

▼**M6**

$$\textit{moyenne pondérée } \log P_{oe} = \frac{\sum_i (\log P_{oei})(surface)}{\textit{surface totale des pics}} = \frac{\sum (\log P_{oei})(surface_i)}{\sum_i surface}$$

La moyenne pondérée log P_{oe} est valide uniquement pour les substances ou les mélanges («tall-oils» par exemple) composés d'homologues (série d'alcanes par exemple). Des mesures et résultats probants peuvent être obtenus avec les mélanges, à condition que le détecteur analytique utilisé ait la même sensibilité envers toutes les substances du mélange et qu'elles puissent être analysées de manière adéquate.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

11. La constante de dissociation, la formule structurale et la solubilité dans la phase mobile doivent être connues avant toute utilisation de la méthode. Par ailleurs, des informations sur l'hydrolyse seraient utiles.

CRITÈRES DE QUALITÉ

12. Pour accroître la confiance dans la mesure, des déterminations dupliquées doivent être effectuées.

— Répétabilité: la valeur de log P_{oe} dérivée de mesures répétées effectuées dans des conditions identiques, et en utilisant le même ensemble de substances de référence, doit être identique à ± 0,1 unité logarithmiques près.

— Reproductibilité: si les mesures sont répétées avec un autre ensemble de substances de référence, les résultats peuvent être différents. Généralement, le coefficient de corrélation R pour la relation entre log k et log P_{oe} pour un ensemble de substances d'essai est d'environ 0,9, ce qui correspond à des coefficients de partage octanol/eau de log P_{oe} identiques à ± 0,5 unité logarithmiques près.

13. L'essai comparatif inter-laboratoires a montré que, avec la méthode HPLC, les valeurs log P_{oe} peuvent être obtenues à ± 0,5 unité des valeurs de Shake-Flask (2). La littérature propose d'autres comparaisons (4)(5)(10)(11)(12). Ce sont les graphiques de corrélation basés sur des substances de référence structurellement proches qui produisent les résultats les plus précis (13).

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

14. Pour corréler le facteur de capacité mesuré k d'une substance avec son P_{oe}, il convient d'établir un graphique d'étalonnage utilisant au moins 6 points (voir le paragraphe 24). Il appartient à l'utilisateur de choisir les substances de référence appropriées. Normalement, celles-ci doivent avoir des valeurs log P_{oe} qui englobent le log P_{oe} de la substance d'essai. Autrement dit, au moins une substance de référence doit avoir un P_{oe} supérieur à celui de la substance d'essai, et une autre un P_{oe} inférieur à celui de la substance d'essai. L'extrapolation ne doit être utilisée que dans des cas exceptionnels. Il est préférable que ces substances de référence soient structurellement proches de la substance d'essai. Les valeurs log P_{oe} des substances de référence utilisées pour l'étalonnage doivent être basées sur des données expérimentales fiables. Toutefois, pour les substances avec un log P_{oe} élevé (normalement supérieur à 4), des valeurs calculées peuvent être utilisées, sauf s'il existe des données expérimentales disponibles fiables. Si des valeurs extrapolées sont utilisées, une valeur limite doit être précisée.

15. Des listes de valeurs log P_{oe} pour de nombreux groupes de substances chimiques sont disponibles (14)(15). Si aucune donnée n'est disponible sur les coefficients de partage de substances structurellement proches, un étalonnage plus général, établi avec d'autres substances de référence, peut être utilisé. Le Tableau 1 présente les substances de référence recommandées, avec leurs valeurs de P_{oe}. Pour les substances ionisables, les valeurs données s'appliquent à leur forme non ionisée. La plausibilité et la qualité de ces valeurs ont été contrôlées au cours de l'essai comparatif inter-laboratoires.

▼**M6**

Tableau 1

Substances de référence recommandées

	Numéro CAS	Substances de référence	log P_{oe}	pKa
1	78-93-3	2-Butanone (Méthyl éthyl cétone)	0,3	
2	1122-54-9	4-Acétylpyridine	0,5	
3	62-53-3	Aniline	0,9	
4	103-84-4	Acétanilide	1,0	
5	100-51-6	Alcool benzylique	1,1	
6	150-76-5	Éther monométhylique d'hydroquinone	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Acide phénoxyacétique	1,4	pKa = 3,12
8	108-95-2	Phénol	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	Dinitro-2,4 phénol	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	Benzonitrile	1,6	
11	140-29-4	Phényl acétonitrile	1,6	
12	589-18-4	Alcool méthyl-4 benzylique	1,6	
13	98-86-2	Acétophénone	1,7	
14	88-75-5	Nitro-2 phénol	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	Acide 3-nitrobenzoïque	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	Chloro-4 aniline	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nitrobenzène	1,9	
18	104-54-1	alcool cinnamique	1,9	
19	65-85-0	Acide benzoïque	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	Crésol (para-)	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3	Acide cinnamique (trans)	2,1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans)
22	100-66-3	Anisole	2,1	
23	93-58-3	Benzoate de méthyle	2,1	
24	71-43-2	Benzène	2,1	
25	99-04-7	Acide toluique (méta-)	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	Chlorophénol (para-)	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Trichloroéthylène	2,4	
28	1912-24-9	Atrazine	2,6	
29	93-89-0	Benzoate d'éthyle	2,6	

▼**M6**

	Numéro CAS	Substances de référence	log P_{oe}	pKa
30	1194-65-6	2,6-Dichlorobenzonitrile	2,6	
31	535-80-8	Acide chloro-3-benzoïque	2,7	pKa = 3,82
32	108-88-3	Toluène	2,7	
33	90-15-3	Naphthol-1	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-Dichloroaniline	2,8	
35	108-90-7	Chlorobenzène	2,8	
36	1746-13-0	Phénoxylate d'allyle	2,9	
37	108-86-1	Bromobenzène	3,0	
38	100-41-4	Éhylbenzène	3,2	
39	119-61-9	Benzophénone	3,2	
40	92-69-3	4-Phénylphénol	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Thymol	3,3	
42	106-46-7	Dichloro-1,4 benzène	3,4	
43	122-39-4	Diphénylamine	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naphthalène	3,6	
45	93-99-2	Phényl benzoate	3,6	
46	98-82-8	Cumène	3,7	
47	88-06-2	Trichloro-2,4,6 phénol	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Biphényle	4,0	
49	120-51-4	Benzoate de benzyle	4,0	
50	88-85-7	Dinosèbe	4,1	
51	120-82-1	Trichloro-1,2,4 benzène	4,2	
52	143-07-7	Acide dodécanoïque	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Éther diphénylique	4,2	
54	85-01-8	Phénanthrène	4,5	
55	104-51-8	Butylbenzène normal	4,6	
56	103-29-7	Dibenzyle	4,8	
57	3558-69-8	2,6-Diphénylpyridine	4,9	
58	206-44-0	Fluoranthène	5,1	
59	603-34-9	Triphénylamine	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

▼M6

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Estimation préliminaire du coefficient de partage

16. Si besoin est, le coefficient de partage de la substance d'essai peut être estimé, de préférence par une méthode de calcul (voir l'appendice), ou le cas échéant, en utilisant le rapport de solubilité de la substance d'essai dans les solvants purs.

Appareillage

17. Un chromatographe en phase liquide équipé d'une pompe à basse impulsion et d'un système de détection approprié est nécessaire. Un détecteur UV, utilisant une longueur d'ondes de 210 nm, ou un détecteur RI conviennent pour une large gamme de groupes chimiques. La présence de groupes polaires dans la phase stationnaire peut gravement perturber les performances de la colonne HPLC. Par conséquent, il convient que les phases stationnaires comptent un pourcentage aussi réduit que possible de groupes polaires (16). Des ensembles phase inverse à microparticules ou des colonnes prêtes à l'emploi proposés dans le commerce peuvent être utilisés. Une colonne de garde peut être positionnée entre le système d'injection et la colonne analytique.

Phase mobile

18. On utilise du méthanol pour HPLC et de l'eau distillée ou dé-ionisée pour préparer le solvant d'élution, qui est ensuite dégazé avant utilisation. Il convient d'employer l'élution isocratique. Des rapports méthanol/eau avec une teneur minimale en eau de 25 pour cent doivent être utilisés. Généralement, un mélange méthanol-eau 3:1 (v/v) convient pour les substances éluantes avec un log P de 6 en une heure, à un débit de 1 ml/min. Pour les substances avec un log P supérieur à 6, il peut être nécessaire de raccourcir le temps d'élution (et ceux des substances de référence) en diminuant la polarité de la phase mobile ou la longueur de la colonne.

19. La substance d'essai et les substances de référence doivent être solubles dans la phase mobile, à une concentration suffisante pour permettre leur détection. Des additifs peuvent être utilisés avec le mélange méthanol-eau, mais dans des cas exceptionnels uniquement dans la mesure où ils modifient les propriétés de la colonne. Dans ces cas-là, il faut confirmer que le temps de rétention des substances d'essai et de référence ne sont pas influencés. Si un mélange méthanol-eau n'est pas approprié, d'autres mélanges solvant organique-eau peuvent être utilisés, par exemple, éthanol-eau, acétonitrile-eau ou alcool isopropylique (2-propanol)-eau.

20. Le pH de l'éluant est un facteur critique pour les substances ionisables. Il doit être compris dans la plage opérationnelle de la colonne, soit généralement entre 2 et 8. Le tamponnage est recommandé. Toutes les précautions doivent être prises pour éviter la précipitation saline et la détérioration de la colonne qui peuvent survenir avec certains mélanges phase organique/tampon. Les mesures HPLC effectuées avec des phases stationnaires à base de silice au-delà d'un pH 8 ne sont pas recommandées, du fait que l'emploi d'une phase mobile alcaline est susceptible d'entraîner une détérioration rapide des performances de la colonne.

Solutés

21. Les substances d'essai et de référence doivent être suffisamment pures pour permettre l'attribution précise des pics figurant sur les chromatogrammes aux différentes substances. Si possible, les substances utilisées en essai ou pour l'étalonnage sont dissoutes dans la phase mobile. Si un solvant autre que la phase mobile est utilisé pour dissoudre les substances d'essai et de référence, la phase mobile doit être utilisée pour la dilution finale avant injection.

Conditions expérimentales

22. Au cours des mesures, la température ne doit pas varier de plus de ± 1 °C.

▼M6

Détermination du temps mort t_0

23. Le temps mort t_0 peut être mesuré à partir des substances organiques non retenues (thiourée ou formamide, par exemple). Un temps mort plus précis peut être dérivé des temps de rétention mesurés ou d'un ensemble d'approximativement sept membres d'une série homologue (cétones n-alkyl méthyl, par exemple) (17). Un tracé des temps de rétention t_R (n_C + 1) est relevé en fonction de t_R (n_C), où n_C est le nombre d'atomes de carbone. On obtient une droite, t_R (n_C + 1) = A t_R (n_C) + (1 – A)t_0, où A, représentant $k(n_C + 1)/k(n_C)$, est constant. Le temps mort t_0 est obtenu à partir du point de rencontre (1 – A)t_0 et de la pente A.

Équation de régression

24. L'étape suivante consiste à tracer un log de corrélation k en fonction d'un log P pour les substances de référence appropriées avec des valeurs log P proches de la valeur attendue pour la substance d'essai. Dans la pratique, entre 6 et 10 substances de référence sont injectées simultanément. Les temps de rétention sont déterminés, de préférence sur un intégrateur d'enregistrement raccordé au système de détection. Les logarithmes correspondants des facteurs de capacité, log k, sont tracés comme une fonction de log P. L'équation de régression est exécutée à intervalles réguliers, au moins une fois par jour, de façon à prendre en compte les modifications éventuelles des performances de la colonne.

DÉTERMINATION DU P_{oe} DE LA SUBSTANCE D'ESSAI

25. On injecte la substance d'essai dans les plus petites quantités décelables. Le temps de rétention est déterminé lors d'une procédure identique. Le coefficient de partage de la substance d'essai est obtenu par interpolation du facteur de capacité calculé sur le graphique d'étalonnage. Pour les coefficients de partage très bas ou très élevés, l'extrapolation est nécessaire. Dans ces cas, une attention particulière doit être portée aux limites de confiance de la ligne de régression. Si le temps de rétention de l'échantillon est en dehors de la plage des temps de rétention obtenus pour les standards, une valeur limite doit être précisée.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Rapport d'essai

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

— le cas échéant, l'estimation préliminaire du coefficient de partage, les valeurs estimées et la méthode utilisée; et si une méthode de calcul a été utilisée, sa description complète, avec l'identification de la base de données et une information détaillée sur le choix des fragments;

— substances d'essai et de référence: pureté, formule structurale et numéro CAS;

— description de l'équipement et des conditions opérationnelles: colonne analytique, colonne de garde;

— phase mobile, moyens de détection, plage de températures, pH;

— profils d'élution (chromatogrammes);

— temps mort et méthode de mesure;

— données de rétention et valeurs log P_{oe} dans la littérature pour les substances de référence utilisées lors de l'étalonnage;

— détails sur la ligne de régression ajustée (log k en fonction de log P_{oe}) et le coefficient de corrélation de la ligne, avec les intervalles de confiance;

▼**M6**

— données moyennes de rétention et valeur log P_{oe} interpolée pour la substance d'essai;

— dans le cas d'un mélange: chromatogramme du profil d'élution avec valeurs de seuil indiquées;

— valeurs log P_{oe} par rapport au pourcentage de surface du pic log P_{oe};

— calcul à l'aide d'une ligne de régression;

— valeurs log P_{oe} moyennes pondérées calculées, le cas échéant.

BIBLIOGRAPHIE

(1) C.V. Eadsforth et P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. Chemosphere. Soc. 12, 1459.

(2) W. Klein, W. Kördel, M. Weiss et H.J. Poremski. (1988). Updating of the OECD Test Guideline 107 Partition Coefficient n-Octanol-Water, OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method. Chemosphere. Soc. 17, 361.

(3) C.V. Eadsforth. (1986). Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient. Pesticide Science. Soc. 17, 311.

(4) H. Ellgehausen, C. D'Hondt et R. Fuerer (1981). Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. Pesticide. Science. Soc. 12, 219.

(5) B. McDuffie (1981). Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. Chemosphere. Soc. 10, 73.

(6) OCDE (2000). Ligne directrice pour les essais de produits chimiques — Partition Coefficient (n- octanol/water): pH-metric Method for lonisable Substances. Projet de Ligne directrice Novembre 2000.

(7) OSPAR (1995). «Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995», Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Annex 10, Oviedo, 20-24 février 1995.

(8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez et C. C. Karman. (1999). An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Version 1.0, 3. Août.

(9) E. A. Vik, S. Bakke et K. Bansal. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. Environmental Modelling & Software Vol. 13, pp. 529-537.

(10) L.O. Renberg, S.G. Sundstroem et K. Sundh-Nygård. (1980). Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography. Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes. Chemosphere. Soc. 9, 683.

(11) W.E. Hammers, G.J.Meurs et C.L. De-Ligny (1982). Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. J. Chromatography 247, 1.

(12) J.E. Haky et A.M. Young. (1984). Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. J. Liq. Chromatography. Soc. 7, 675.

(13) S. Fujisawa et E. Masuhara. (1981). Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography Journal of Biomedical Materials Research. 15, 787.

▼**M6**

(14) C. Hansch et A. J. Leo. (1979). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Willey, New York.

(15) C. Hansch, président; A.J. Leo, dir. (1982). Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity — Available from Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, Californie 91711.

(16) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther. 14, 479.

(17) G.E. Berendsen, P.J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony, et J. Inczédy. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. J. Liq. Chromato. 3, 1669.

▼M6

Appendice

Méthodes de calcul du P_{oe}

INTRODUCTION

1. Cette appendice propose une rapide introduction au calcul du P_{oe}. Pour plus d'informations, se reporter aux ouvrages (1)(2).

2. Les valeurs calculées du P_{oe} sont utilisées pour:

   — choisir la méthode expérimentale à utiliser: méthode Shake Flask pour un log P_{oe} entre – 2 et 4, et méthode HPLC pour un log P_{oe} entre 0 et 6;

   — sélectionner les conditions à utiliser en HPLC (substances de référence, ratio méthanol/eau);

   — contrôler la plausibilité des valeurs obtenues par les méthodes expérimentales;

   — proposer une estimation lorsque les méthodes expérimentales ne peuvent pas être appliquées.

Principe des méthodes de calcul

3. Les méthodes de calcul proposées ici sont basées sur la fragmentation théorique de la molécule en sous-structures pour lesquelles on connaît des incréments log P_{oe} fiables. Le log P_{oe} est obtenu par addition des valeurs fragmentales et des termes correctifs pour les interactions intramoléculaires. Des listes de constantes fragmentales et de termes correctifs sont données dans les ouvrages (1)(2)(3)(4)(5)(6). Certaines sont régulièrement mises à jour (3).

Fiabilité des valeurs calculées

4. En général, la fiabilité des méthodes de calcul diminue à mesure qu'augmente la complexité de la substance étudiée. Dans le cas des molécules simples, de faible poids moléculaire et avec un ou deux groupes fonctionnels, on peut tabler sur une déviation de 0,1 à 0,3 unité de log P_{oe} entre les résultats des différentes méthodes de fragmentation et les valeurs mesurées. La marge d'erreur dépend de la fiabilité des constantes fragmentales utilisées, de la capacité à reconnaître les interactions intramoléculaires (liaisons hydrogène, par exemple) et de l'utilisation appropriée des termes correctifs. Dans le cas des substances ionisantes, la charge et le degré de l'ionisation doivent être prises en compte (10).

Méthode π de Fujita-Hansch

5. La constante du substituant hydrophobe, π, introduite à l'origine par Fujita et al. (7) est définie de la manière suivante:

$$^{\pi}X = \log P_{oe}\,(PhX) - \log P_{oe}\,(PhH)$$

où PhX est un dérivé aromatique et PhH la substance mère.

$$\begin{aligned} \text{par exemple,}\quad ^{\pi}Cl &= \log P_{oe}\,(C6H5Cl) - \log P_{oe}\,(C_6H_6) \\ &= 2{,}84 - 2{,}13 \\ &= 0{,}71 \end{aligned}$$

La méthode π est avant tout intéressante pour les substances aromatiques. Les valeurs π d'un grand nombre de substituants sont disponibles dans la littérature (4)(5).

Méthode de Rekker

6. Avec la méthode de Rekker (8), la valeur log P_{oe} est calculée de la manière suivante:

$$Log\ P_{oe} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{termes d}'\text{interaction})$$

▼M6

où a_i est le nombre de fragments identiques dans une molécule, et f_i l'incrément log P_{oe} du fragment. Les termes d'interaction peuvent être exprimés sous forme d'un multiple intégral d'une constante C_m (la fameuse «constante magique»). Les constantes fragmentales f_i et C_m ont été déterminées à partir d'une liste de 1 054 valeurs P_{oe} expérimentales de 825 substances à l'aide d'une analyse de régression multiple (6)(8). La détermination des termes d'interaction est menée selon les règles fixées (6)(8)(9).

Méthode de Hansch-Leo

7. Avec la méthode de Hansch et Leo (4), la valeur log P_{oe} est calculée de la manière suivante:

$$\text{Log } P_{oe} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

où f_i est une constante fragmentale, F_j un terme correctif (facteur), a_i et b_j les fréquences d'occurrence correspondantes. Les listes des valeurs fragmentales atomiques et de groupe, et des termes correctifs F_j, ont été dérivées par une méthode empirique à partir de valeurs P_{oe} expérimentales. Les termes correctifs ont été divisés en plusieurs classes différentes (1)(4). Des logiciels prenant en compte l'ensemble des règles et termes correctifs ont été développés (3).

MÉTHODE COMBINÉE

8. Le calcul du log P_{oe} des molécules complexes peut être considérablement amélioré, si ces molécules sont disséquées en sous-structures importantes pour lesquelles on dispose de valeurs log P_{oe} fiables, soit proposées dans la littérature (3)(4) soit provenant de mesures. Ces fragments (hétérocycles, anthraquinone, azobenzène, par exemple) peuvent ensuite être combinés avec les valeurs de Hansch- π, ou avec les constantes fragmentales de Rekker ou Leo.

Remarques

i) Les méthodes de calcul sont applicables uniquement à des substances partiellement ou complètement ionisées, lorsque les facteurs correctifs nécessaires ont été pris en compte.

ii) Dans l'hypothèse qu'il existe des liaisons hydrogène intramoléculaires, les termes correctifs correspondants (approximativement + 0,6 à + 1,0 unité log P_{oe}) doivent être ajoutés (1). Des modèles stéréo et autres données spectroscopiques peuvent donner des indications sur la présence éventuelle de telles liaisons.

iii) Si plusieurs formes tautomériques sont possibles, la forme la plus probable doit être utilisée comme base pour le calcul.

iv) Les révisions des listes de constantes fragmentales doivent être suivies avec attention.

BIBLIOGRAPHIE SUR LES MÉTHODES DE CALCUL

(1) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1982).

(2) W.J. Dunn, J.H. Block et R.S. Pearlman (dir. publ.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (New York) etOxford (1986).

(3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, Californie 91711, Etats-Unis, Log P Database and Med. Chem Software (Program CLOGP-3).

(4) C. Hansch et A.J. Leo. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979).

▼**M6**

(5) Leo, C. Hansch et D. Elkins. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chemical. Reviews*. 71, 525.

(6) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem*. — *Chim. Ther*. 14, 479.

(7) Toshio Fujita, Junkichi Iwasa & Corwin Hansch (1964). A New Substituent Constant, π, Derived from Partition Coefficients. *J. Amer. Chem. Soc*. 86, 5175.

(8) R.F. Rekker. The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Vol. 1, Elsevier, New York (1977).

(9) C.V. Eadsforth et P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere*. 12, 1459.

(10) R.A. Scherrer. ACS — Symposium Series 255, p. 225, American Chemical Society, Washington, D. C. (1984).

▼M7

A.25. CONSTANTE DE DISSOCIATION DANS L'EAU (MÉTHODE VOLUMÉTRIQUE — MÉTHODE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE — MÉTHODE CONDUCTIMÉTRIQUE)

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 112 (1981) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.

Conditions préalables

— Méthode analytique appropriée

— Solubilité dans l'eau

Informations générales

— Formule structurale

— Conductivité électrique pour la méthode conductimétrique

Conditions particulières

— Toutes les méthodes d'essai peuvent être effectuées sur des substances de pureté analytique ou commerciale. On doit examiner les effets éventuels des impuretés sur les résultats.

— La méthode volumétrique n'est pas adaptée aux substances de faible solubilité (voir Solutions d'essai, ci-dessous).

— La méthode spectrophotométrique n'est applicable qu'aux substances qui possèdent des spectres d'absorption UV-VIS suffisamment différents pour les formes dissociées et non-dissociées. Cette méthode peut également être appliquée aux substances de faible solubilité et pour les dissociations non-acide/base par exemple la formation de complexes.

— Dans le cas où on peut employer l'équation d'Onsager, la méthode conductimétrique peut être utilisée, même à des concentrations relativement faibles et même dans les cas d'équilibres non¬acide/base.

Documents de référence

La présente méthode d'essai est basée sur les méthodes indiquées dans les références énumérées dans la rubrique «Bibliographie» et sur le document guide préliminaire pour la notification avant fabrication (EPA, 18 août 1978.

METHODE — INTRODUCTION, OBJET, PORTEE, PERTINENCE, APPLICATION ET LIMITES DE D'ESSAI

La dissociation d'une substance dans l'eau est un paramètre important pour évaluer l'impact de la substance sur l'environnement. Ce paramètre fixe la forme de la substance qui, à son tour détermine son comportement et son transport. Il peut affecter l'adsorption de la substance chimique sur les sols et les sédiments ainsi que l'absorption à l'intérieur des cellules biologiques.

Définitions et unités

La dissociation est le partage réversible en deux ou plusieurs espèces chimiques qui peuvent être ionisées. Le processus est généralement indiqué par l'équilibre:

$$RX \rightleftharpoons R^{+} + X^{-}$$

et la constante d'équilibre gouvernant la réaction est:

$$K = \frac{[R^{+}][X^{-}]}{[RX]}$$

Par exemple, dans le cas particulier où R est de l'hydrogène (la substance est un acide), la constante est:

▼M7

$$K_\alpha = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

ou

$$pK_\alpha = pH - \log \frac{[X^-]}{[HX]}$$

Substances de référence

Quand on étudie une nouvelle substance, il n'est pas nécessaire d'utiliser à chaque fois les substances de référence ci-dessous. Elles sont surtout fournies pour pouvoir effectuer de temps en temps l'étalonnage de la méthode et pour permettre de comparer les résultats obtenus avec une autre méthode.

	pK_a ([1])	Température en °C
p-nitrophénol	7,15	25 ([1])
Acide benzoïque	4,12	20
p-Chloroaniline	3,93	20

([1]) Il n'existe pas de valeur pour 20 °C, mais on peut considérer que la variabilité des résultats des mesures est supérieure aux variations dues à la température

Il serait utile de disposer d'une substance qui possède plusieurs pK, comme cela est indiqué dans «Principe de la méthode», ci-dessous. Une telle substance pourrait être:

Acide citrique	pK_a (8)	Température.en °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Principe de la méthode

Le processus chimique décrit ici ne varie en général que peu en fonction de la température, dans le domaine des températures rencontrées dans l'environnement. La détermination de la constante de dissociation implique la mesure des concentrations des formes dissociées et non- dissociées de la substance chimique étudiée. En connaissant la stœchiométrie de la réaction de dissociation indiquée dans la rubrique «Définitions et unités», ci-dessus, on peut déterminer la constante correspondante. Dans le cas particulier de cette méthode d'essai, la substance se comporte comme un acide ou une base, et il est plus commode d'effectuer la détermination en mesurant les concentrations relatives des formes ionisées et non-ionisées de la substance, ainsi que le pH de la solution. La relation qui existe entre ces différents termes est donnée dans l'équation du pK_a dans la rubrique «Définitions et unités», ci-dessus. Certaines substances possèdent plus d'une constante de dissociation et on peut alors écrire des équations similaires. Quelques-unes des méthodes décrites ici sont également applicables aux dissociations non-acide/base.

Critères de qualité

Reproductibilité

La mesure de la constante de dissociation doit être répétée au moins trois fois, les valeurs doivent se situer dans un intervalle de ± 0,1 unités de log.

MODE OPERATOIRE

Il existe deux façons de déterminer le pK_a. L'une implique le dosage volumétrique d'une quantité connue de substance par un acide ou une base de référence selon le cas; l'autre consiste à déterminer la concentration relative des formes ionisées et non-ionisées, ainsi que leur variation en fonction du pH.

▼M7

Préparations

Les méthodes basées sur ces deux principes peuvent être classées en méthodes volumétriques, méthodes spectrophotométriques et méthodes conductimétriques.

Solutions d'essai

Pour les méthodes volumétrique et conductimétrique, la substance chimique doit être dissoute dans l'eau distillée. Pour la méthode spectrophotométrique et les autres méthodes on emploie des solutions tampons. La concentration de la substance à tester ne doit pas dépasser 0,01 M ou la moitié de la concentration de saturation; pour faire les solutions on doit employer la substance sous la forme la plus pure qu'on puisse trouver. Si la substance n'est que faiblement soluble, elle peut être dissoute dans une petite quantité de solvant miscible à l'eau avant d'être diluée pour atteindre les concentrations indiquées ci-dessus.

Si on a utilisé un co-solvant pour améliorer la solubilité, on doit vérifier l'absence d'émulsions dans les solutions, à l'aide d'un faisceau Tyndall. Quand des solutions tampons sont utilisées, la concentration du tampon ne doit pas excéder 0,05 M.

Conditions expérimentales

Température

La température doit être contrôlée à ± 1 °C près au moins. L'expérience doit, de préférence, être réalisée à 20 °C.

Si on pense que les résultats varient de façon significative avec la température, on doit répéter la détermination à deux autres températures, au moins. Dans ce cas, les intervalles de température doivent être de 10 °C, et la température doit être maintenue constante à ± 0,1 °C près.

Analyses

La méthode à employer sera déterminée par la nature de la substance à étudier. Elle doit être suffisamment sensible pour permettre la détermination des différentes espèces présentes à chaque concentration des solutions étudiées.

Exécution de l'essai

Méthode volumétrique

La solution d'essai est dosée par titration avec une solution de référence d'acide ou de base, selon le cas; on mesure le pH après chaque addition du produit titrant. On doit faire au moins 10 additions avant le point d'équivalence. Si l'équilibre est atteint assez rapidement, on peut utiliser un potentiomètre enregistreur. Pour cette méthode, il est nécessaire de connaître de façon précise, à la fois la quantité totale de substance et sa concentration. On doit prendre soin d'éliminer le dioxyde de carbone. Les détails du mode opératoire, des précautions à prendre, et des calculs sont donnés dans les essais normalisés, par exemple dans les références (1), (2), (3) et (4).

Méthode spectrophotométrique

On doit trouver une longueur d'onde où les formes ionisées et non-ionisées de la substance ont des coefficients d'extinction suffisamment différents. On enregistre le spectre d'absorption UV- VIS de solutions de concentration constante, dans des conditions de pH où la substance est pratiquement non-ionisée, puis complètement ionisée, et enfin, à plusieurs pH intermédiaires. Ceci peut être réalisé, soit en ajoutant de l'acide (ou de la base) concentré à un volume relativement important d'une solution de la substance dans un tampon à plusieurs composants, initialement à pH élevé (faible) (réf 5), soit en ajoutant des volumes égaux d'une solution-mère de la substance, par exemple dans l'eau ou le méthanol, à des volumes constants de diverses solutions tampons, couvrant le domaine du pH désiré. A partir des valeurs de pH et d'absorbance à la longueur d'onde choisie, on calcule un nombre suffisant de valeurs du pK_a en utilisant les données obtenues pour au moins 5 pH différents pour lesquels le taux d'ionisation de la substance se situe entre 10 % et 90 %. On trouvera d'autres détails expérimentaux et la méthode de calcul dans la référence 1.

▼M7

Méthode conductimétrique

En utilisant une cuve, dont la constante est connue et petite, on mesure la conductivité d'une solution approximativement 0,1 M du composé dans l'eau. Sont également mesurées les conductivités d'un certain nombre de solutions obtenues par des dilutions précises de cette solution-mère. À chaque fois on diminue la concentration de moitié, et l'ensemble doit couvrir au moins un ordre de grandeur de concentration. On trouve la conductivité limite pour une dilution infinie, en effectuant une expérience similaire avec le sel de Na et en extrapolant. On peut alors calculer le degré de dissociation à partir de la conductivité de chaque solution, en utilisant l'équation d'Onsager, et à partir de là, en employant la loi de dilution d'Ostwald, la constante de dissociation peut être calculée par la formule: $K = \alpha^2 C/(1 - \alpha)$ où C est la concentration en moles par litre et α est la fraction dissociée. On doit prendre soin d'éliminer le CO_2. On trouvera d'autres détails expérimentaux et la méthode de calcul dans les textes de référence et dans les références 1, 6 et 7.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Calcul des résultats

Méthode volumétrique

Le pK_a est calculé pour 10 points mesurés sur la courbe de dosage. On calcule la moyenne et la déviation standard de ces pK_a. On doit inclure une courbe du pH en fonction du volume de base ou d'acide de référence ajouté, ainsi qu'une présentation sous forme de tableau.

Méthode spectrophotométrique

Pour chaque spectre on fait entrer dans un tableau l'absorbance et le pH. A partir des points correspondant aux données sur les spectres intermédiaires, on calcule au moins cinq valeurs pour le pK_a, ainsi que la moyenne et la déviation standard de ces résultats.

Méthode conductimétrique

La conductivité équivalente Λ est calculée pour chaque concentration acide et pour chaque concentration d'un mélange d'un équivalent d'acide plus 0,98 équivalent d'hydroxyde de sodium exempt de carbonate. L'acide est en excès afin d'éviter un excès en OH^- dû à l'hydrolyse. Sur un graphique, on porte $1/\Lambda$ en fonction de $\sqrt{C}$, et on peut trouver le Λ_o du sel en extrapolant pour la concentration zéro.

Le Λ_o de l'acide peut être calculé en utilisant les valeurs fournies par la bibliographie pour H+ et Na+. Le pK_a peut être calculé à partir des formules $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_o$ et $K_a = \alpha^2 C/(1 - \alpha)$ pour chaque concentration. On peut obtenir de meilleures valeurs pour K_a en effectuant des corrections pour la mobilité et l'activité. On doit calculer les moyennes et les déviations standard des valeurs des pK_a.

Rapport

Toutes les données brutes et les valeurs calculées pour le pK_a doivent être fournies, ainsi que la méthode de calcul (de préférence sous la forme d'un tableau, comme cela est suggéré dans la référence 1) et les paramètres statistiques décrits ci-dessus. Pour les méthodes volumétriques, on doit donner les détails de la normalisation des produits titrants.

Pour la méthode spectrophotométrique, tous les spectres doivent être fournis. Pour la méthode conductimétrique, on doit reporter les détails de la détermination de la constante de la cuve. On doit donner des informations sur la technique utilisée, les méthodes analytiques et la nature de chacun des tampons employés.

Il convient de noter la ou les température(s) expérimentales.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Albert, A. et Sergeant, E.L.: *Ionization Constants of Acids and Bases*, Wiley, Inc. New York, 1962.

▼**M7**

(2) Nelson, N.H. et Faust S.D.: Constantes de dissociation acide d'herbicides aquatiques sélectionnés, Env. Sci. Tech. 3, II, pp 1186-1188, (1969).

(3) ASTM D 1293 — Normes annuelles de l'ASTM, Philadelphia 1974.

(4) Méthode normalisée 242. APHA/AW WA/WPCF, Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water, 14ème édition, American Public Health Association, Washington, D.C. 1976.

(5) Clark, J. et Cunliffe, A.E.: Mesure spectrophotométrique rapide des constantes d'ionisation en solution aqueuse, Chem. Ind. (London) 281, (March 1973).

(6) ASTM D 1125 — Normes annuelles de l'ASTM, Philadelphia 1974.

(7) Méthode normalisée 205 — APHA/AWWA/NPCF (voir ci-dessus (4)).

(8) *Handbook of Chemistry and Physics, 60ème édition, CRC — Press, Boca Raton, Floride, 33431 (1980).*

▼B

PARTIE B: MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ ET DES AUTRES EFFETS SUR LA SANTÉ

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GÉNÉRALE

B.1 bis. TOXICITÉ ORALE AIGUË — MÉTHODE DE LA DOSE PRÉDÉTERMINÉE

B.1 ter. TOXICITÉ ORALE AIGUË — MÉTHODE DE LA CLASSE DE TOXICITÉ AIGUË

B.2. TOXICITÉ AIGUË PAR INHALATION

B.3. TOXICITÉ AIGUË (CUTANÉE)

B.4. EFFET IRRITANT/CORROSIF AIGU SUR LA PEAU

B.5. EFFET IRRITANT/CORROSIF AIGU SUR LES YEUX

B.6. SENSIBILISATION CUTANÉE

B.7. ÉTUDE DE TOXICITÉ ORALE À DOSE RÉPÉTÉE PENDANT 28 JOURS SUR LES RONGEURS

B.8. TOXICITÉ SUBAIGUË PAR INHALATION: ÉTUDE SUR 28 JOURS

B.9. TOXICITÉ À DOSES RÉPÉTÉES (28 JOURS) (ADMINISTRATION CUTANÉE)

B.10. ESSAI D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE *IN VITRO* CHEZ LES MAMMIFÈRES

B.11. ESSAI D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE SUR MOELLE OSSEUSE DE MAMMIFÈRES

B.12. TEST DU MICRONOYAU SUR ÉRYTHROCYTES DE MAMMIFÈRES

B.13/14. MUTAGÉNICITÉ — ESSAI DE MUTATION RÉVERSE SUR BACTÉRIES

B.17. ESSAIS *IN VITRO* DE MUTATION GÉNIQUE SUR CELLULES DE MAMMIFÈRES UTILISANT LES GÈNES HPRT ET XPRT

B.21. TESTS DE TRANSFORMATION SUR CELLULES DE MAMMIFÈRE IN VITRO

B.22. ESSAI DE MUTATION LÉTALE DOMINANTE CHEZ LE RONGEUR

▼B

B.23. ESSAI D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE SUR SPERMATOGONIES DE MAMMIFÈRES

B.25. TRANSLOCATION HÉRÉDITAIRE CHEZ LA SOURIS

B.26. ESSAI DE TOXICITÉ SUBCHRONIQUE PAR VOIE ORALE — TOXICITÉ ORALE À DOSES RÉPÉTÉES — RONGEURS: 90 JOURS

B.27. ESSAI DE TOXICITÉ SUBCHRONIQUE PAR VOIE ORALE — TOXICITÉ ORALE À DOSES RÉPÉTÉES — NON-RONGEURS: 90 JOURS

B.28. TOXICITÉ DERMIQUE SUBCHRONIQUE — ÉPREUVE DE 90 JOURS SUR DES RONGEURS

B.29. TOXICITÉ SUBCHRONIQUE PAR INHALATION: ÉTUDE SUR 90 JOURS

B.30. ÉTUDES DE TOXICITÉ CHRONIQUE

B.31. ÉTUDE DE LA TOXICITÉ POUR LE DÉVELOPPEMENT PRÉNATAL

B.32. ÉTUDES DE CANCÉROGENÈSE

B.33. ÉTUDES COMBINÉES DE TOXICITÉ CHRONIQUE ET DE CANCÉROGENÈSE

B.34. TEST DE REPRODUCTION SUR UNE GÉNÉRATION

B.35. ÉTUDE DE TOXICITÉ POUR LA REPRODUCTION SUR DEUX GÉNÉRATIONS

B.36. TOXICOCINÉTIQUE

B.37. NEUROTOXICITÉ RETARDÉE DES SUBSTANCES ORGANOPHOSPORÉES APRÈS EXPOSITION AIGUË

B.38. NEUROTOXICITÉ RETARDÉE DES SUBSTANCES ORGANOPHOSPHORÉES — ÉTUDE PAR ADMINISTRATION RÉITÉRÉE SUR 28 JOURS

B.39. ESSAI IN VIVO DE SYNTHÈSE NON PROGRAMMÉE DE L'ADN (UDS) SUR CELLULES HÉPATIQUES DE MAMMIFÈRE

B.40. CORROSION CUTANEE *IN VITRO*: ESSAI DE RESISTANCE ELECTRIQUE TRANSCUTANEE (RET)

B.40 bis. CORROSION CUTANÉE IN VITRO: ESSAI SUR MODÈLE DE PEAU HUMAINE (RhE)

B.41. ESSAI DE PHOTOTOXICITÉ IN VITRO 3T3 NRU

B.42. SENSIBILISATION CUTANÉE: ESSAI DE STIMULATION LOCALE DES GANGLIONS LYMPHATIQUES

▼B

B.43. ÉTUDE DE NEUROTOXICITÉ CHEZ LES RONGEURS

B.44. ABSORPTION CUTANÉE: MÉTHODE IN VIVO

B.45. ABSORPTION CUTANÉE: MÉTHODE IN VITRO

B.46. IRRITATION CUTANÉE *IN VITRO*: ESSAI SUR ÉPIDERME HUMAIN RECONSTITUÉ

B.47. MÉTHODE D'ESSAI D'OPACITÉ ET DE PERMÉABILITÉ DE LA CORNÉE BOVINE POUR L'IDENTIFICATION DES PRODUITS CHIMIQUES I) PROVOQUANT DES LÉSIONS OCULAIRES GRAVES OU II) NE RELEVANT D'AUCUNE CLASSIFICATION POUR IRRITATION OCULAIRE OU LÉSION OCULAIRE GRAVE

B.48. MÉTHODE D'ESSAI SUR ŒIL DE POULET ISOLÉ POUR L'IDENTIFICATION DES PRODUITS CHIMIQUES I) PROVOQUANT DES LÉSIONS OCULAIRES GRAVES ET II) NE RELEVANT D'AUCUNE CLASSIFICATION POUR IRRITATION OCULAIRE OU LÉSION OCULAIRE GRAVE

B.49. TEST DU MICRONOYAU *IN VITRO* SUR CELLULES DE MAMMIFÈRES

B.50. SENSIBILISATION CUTANÉE: ESSAI DE STIMULATION LOCALE DES GANGLIONS LYMPHATIQUES: DA

B.51. SENSIBILISATION CUTANÉE: ESSAI DE STIMULATION LOCALE DES GANGLIONS LYMPHATIQUES: BRDU-ELISA

B.52. TOXICITÉ AIGUË PAR INHALATION – MÉTHODE PAR CLASSE DE TOXICITÉ AIGUË

B.53. ÉTUDE DE NEUROTOXICITE POUR LE DEVELOPPEMENT

B.54. BIOESSAI UTÉROTROPHIQUE CHEZ LES RONGEURS: ESSAI DE DÉPISTAGE À COURT TERME DES PROPRIÉTÉS ŒSTROGÉNIQUES

B.55. BIOESSAI DE HERSHBERGER SUR LE RAT: ESSAI DE DEPISTAGE A COURT TERME DE PROPRIETES (ANTI)ANDROGENIQUES

B.56. ÉTUDE ETENDUE DE TOXICITE POUR LA REPRODUCTION SUR UNE GENERATION

B.57. ESSAI DE STEROÏDOGENESE H295R

B.58. ESSAIS DE MUTATIONS GÉNÉTIQUES DES CELLULES SOMATIQUES ET GERMINALES DE RONGEURS TRANSGÉNIQUES

B.59. SENSIBILISATION CUTANÉE IN CHEMICO: ESSAI DE RÉACTIVITÉ PEPTIDIQUE DIRECT (DPRA)

B.60. SENSIBILISATION CUTANÉE *IN VITRO*: MÉTHODE D'ESSAI ARE-NRF2 LUCIFÉRASE

B.61. MÉTHODE D'ESSAI DE DIFFUSION DE FLUORESCÉINE POUR IDENTIFIER LES SUBSTANCES CORROSIVES ET FORTEMENT IRRITANTES POUR L'ŒIL

B.62. TEST DES COMÈTES *IN VIVO* EN CONDITIONS ALCALINES SUR CELLULES DE MAMMIFÈRES

▼B

B.63. ESSAI DE DÉPISTAGE DE LA TOXICITÉ POUR LA REPRODUCTION ET LE DÉVELOPPEMENT

B.64. ÉTUDE COMBINÉE DE TOXICITÉ À DOSES RÉPÉTÉES ET DE DÉPISTAGE DE LA TOXICITÉ POUR LA REPRODUCTION ET LE DÉVELOPPEMENT

B.65. MÉTHODE D'ESSAI *IN VITRO* SUR MEMBRANE D'ÉTANCHÉITÉ POUR LA CORROSION CUTANÉE

B.66. ESSAIS *IN VITRO* DE TRANSACTIVATION PAR TRANSFECTION STABLE VISANT LA DÉTECTION DES SUBSTANCES AGONISTES ET ANTAGONISTES DES RÉCEPTEURS DES ŒSTROGÈNES

B.67. ESSAIS *IN VITRO* DE MUTATION GÉNIQUE SUR CELLULES DE MAMMIFÈRES UTILISANT LE GÈNE DE LA THYMIDINE KINASE

B.68. MÉTHODE D'ESSAI D'EXPOSITION DE COURTE DURÉE IN VITRO POUR L'IDENTIFICATION DES PRODUITS CHIMIQUES i) PROVOQUANT DES LÉSIONS OCULAIRES GRAVES OU ii) NE RELEVANT D'AUCUNE CLASSIFICATION POUR IRRITATION OCULAIRE OU LÉSION OCULAIRE GRAVE

B.69. MÉTHODE D'ESSAI SUR MODÈLE D'ÉPITHÉLIUM CORNÉEN HUMAIN RECONSTITUÉ (ECHR) POUR L'IDENTIFICATION DE PRODUITS CHIMIQUES NE NÉCESSITANT AUCUNE CLASSIFICATION NI ÉTIQUETAGE POUR IRRITATION OCULAIRE OU LÉSIONS OCULAIRES GRAVES

B.70. ESSAIS *IN VITRO* FAISANT APPEL AU RÉCEPTEUR D'ŒSTROGÈNE RECOMBINANT HUMAIN (HRER) POUR LA DÉTECTION DES PRODUITS CHIMIQUES AYANT UNE AFFINITÉ DE LIAISON AVEC LES RÉCEPTEURS DES ŒSTROGÈNES

B.71. ESSAIS DE SENSIBILISATION CUTANÉE *IN VITRO* PORTANT SUR L'ÉVÉNEMENT CLÉ RELATIF À L'ACTIVATION DES CELLULES DENDRITIQUES DANS LA VOIE TOXICOLOGIQUE IMPLIQUÉE DANS LES EFFETS INDÉSIRABLES (AOP) DE SENSIBILISATION CUTANÉE

▼B

INTRODUCTION GÉNÉRALE

A. **CARACTÉRISATION DE LA SUBSTANCE À TESTER**

Avant d'entreprendre toute étude de toxicité, il faut connaître la composition de la substance à tester, y compris les principales impuretés, ainsi que ses propriétés physico-chimiques dont sa stabilité.

Les propriétés physico-chimiques de la substance fournissent des informations importantes pour le choix de la voie d'administration, pour la conception des différentes études, ainsi que pour la manipulation et le stockage de la substance.

La mise au point d'une méthode d'analyse permettant une évaluation qualitative et quantitative de la substance à tester (y compris, si possible, de ses principales impuretés) dans le véhicule d'administration et dans le matériel biologique doit précéder la mise en œuvre de l'étude.

Toutes les informations concernant l'identification, les propriétés physico-chimiques, la pureté et le comportement de la substance à tester doivent être consignées dans le procès-verbal d'essai.

B. **SOIN DES ANIMAUX**

Lors des essais de toxicité, il est essentiel de procéder à des contrôles stricts des conditions ambiantes et d'utiliser des techniques appropriées de soin des animaux.

i) *Conditions d'hébergement*

Les conditions ambiantes dans les locaux ou enceintes réservés aux animaux d'expérience doivent être adaptées à l'espèce utilisée pour l'essai. Pour les rats, les souris et les cobayes, la température ambiante doit être de 22 ^{o}C ± 3 ^{o}C et l'humidité relative de 30 à 70 %; pour les lapins, la température doit être de 20 ^{o}C ± 3 ^{o}C et l'humidité relative de 30 à 70 %.

Certaines techniques expérimentales sont particulièrement sensibles aux effets thermiques et, dans de tels cas, des indications précises concernant les conditions adéquates figurent dans la description de la méthode d'essai. Dans tous les essais de toxicité, la température et l'humidité doivent être contrôlées et consignées, et doivent figurer dans le rapport final d'étude.

Un éclairage artificiel doit garantir l'alternance de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les détails concernant les conditions d'éclairage doivent être consignés dans le rapport final d'étude.

Sauf si la méthode prévoit d'autres conditions, les animaux doivent être hébergés individuellement ou mis en cage par petits groupes de même sexe. Les cages collectives ne doivent pas contenir plus de cinq animaux.

Il est important que les comptes rendus d'expérimentation animale précisent le type de cage utilisé et le nombre d'animaux par cage lors de l'exposition à la substance chimique et pendant toute période d'observation qui suit.

▼B

ii) *Conditions d'alimentation*

Le régime alimentaire doit répondre à tous les besoins nutritionnels de l'espèce soumise à l'expérience. Lorsque les substances à tester sont administrées dans la nourriture, il se peut que la valeur nutritionnelle de cette dernière soit amoindrie par une interaction entre la substance et un ingrédient de l'alimentation. Cette éventualité doit être prise en compte lors de l'interprétation des résultats de l'essai. Les régimes alimentaires classiquement utilisés en laboratoire sont acceptables, l'eau de boisson étant fournie à satiété. Le choix du régime alimentaire peut être guidé par la nécessité de garantir une proportion appropriée de substance en cas d'administration par cette méthode.

Les contaminants alimentaires qui agissent sur la toxicité ne doivent pas être présents à des concentrations susceptibles d'influencer les résultats.

C. **MÉTHODES ALTERNATIVES**

L'UE attache une grande importance à la mise au point et à la validation de méthodes alternatives qui fournissent autant d'informations que les expérimentations animales actuelles, mais qui nécessitent moins d'animaux, minimisent leurs souffrances et permettent d'éviter leur sacrifice.

Dès que de telles méthodes sont disponibles, elles doivent être envisagées, chaque fois que cela est possible, pour la caractérisation des dangers et pour la classification et l'étiquetage des substances en fonction des dangers intrinsèques.

D. **ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION**

L'extrapolation directe à l'homme des résultats des expériences sur les animaux et des essais in vitro n'est possible que dans certaines limites; il faut en tenir compte lors de l'évaluation et de l'interprétation des essais; aussi, lorsque des effets indésirables ont été mis en évidence chez l'homme, ces données peuvent être utilisées pour confirmer les résultats expérimentaux.

E. **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

La plupart des méthodes présentées ici sont élaborées dans le cadre du programme de lignes directrices de l'OCDE en matière d'essais. Ces méthodes doivent être mises en œuvre conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, afin de garantir l'acceptation mutuelle des données.

De plus amples informations peuvent être obtenues dans les références citées dans les lignes directrices de l'OCDE et dans d'autres publications pertinentes.

▼B

B.1 bis. **TOXICITÉ ORALE AIGUË — MÉTHODE DE LA DOSE PRÉDÉTERMINÉE**

1. **MÉTHODE**

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 420 (2001) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

Les méthodes traditionnelles pour évaluer la toxicité aiguë utilisent comme effet observé la mort des animaux. En 1984, la British Toxicology Society (BTS) a proposé une nouvelle approche pour les essais de toxicité aiguë, utilisant des doses prédéterminées (1). Cette méthode évitait d'utiliser la mort des animaux comme effet observé et s'appuyait plutôt sur l'observation de signes manifestes de toxicité apparaissant après traitement à une dose prédéterminée. À la suite des études de validation in vivo au Royaume-Uni (2) et au niveau international (3), cette procédure a été adoptée comme ligne directrice en 1992. Après cela, les propriétés statistiques de la méthode de la dose prédéterminée ont été évaluées dans une série d'études utilisant des modèles mathématiques (4) (5) (6). Ensemble, les études in vivo et celles fondées sur des modèles mathématiques ont démontré que la procédure était reproductible et utilisait moins d'animaux auxquels elle occasionnait moins de souffrance que les méthodes traditionnelles. Elle permet de classer les substances par ordre de toxicité, de la même manière que les autres méthodes d'essai de toxicité aiguë.

Des indications permettant de choisir la méthode d'essai la plus appropriée pour un but donné sont présentées dans le document d'orientation sur les essais de toxicité orale aiguë (7). Ce document contient également de plus amples informations sur la conduite et l'interprétation de la méthode d'essai B.1 bis.

La méthode de la dose prédéterminée a comme principe de n'utiliser, pour l'étude principale, que des doses modérément toxiques et d'éviter d'administrer des doses qui peuvent s'avérer létales. De même, il n'est pas nécessaire d'administrer des doses dont on sait qu'elles provoquent des douleurs et une détresse importante du fait de propriétés corrosives ou sévèrement irritantes. Au cours de l'essai, les animaux moribonds et les animaux souffrant de façon manifeste ou montrant des signes de détresse grave devront être euthanasiés. Ces animaux devront être pris en compte dans l'interprétation des résultats au même titre que les animaux morts au cours de l'essai. Les critères pour décider d'euthanasier les animaux moribonds et ceux qui souffrent de façon manifeste, ainsi que les orientations pour reconnaître une mort prévisible ou imminente, font l'objet d'un autre document d'orientation (8).

La méthode fournit des informations qui permettent à la fois l'évaluation des dangers et le classement des substances selon le système général harmonisé de classification (SGH) des substances ayant une toxicité aiguë (9).

Le laboratoire doit rassembler toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de procéder à l'essai. Ces informations comprennent l'identité et la structure chimique de la substance, ses propriétés physico-chimiques, les résultats obtenus dans tous les autres essais de toxicité in vitro et in vivo, les données toxicologiques concernant des substances structurellement apparentées, ainsi que le ou les usages escomptés de la substance. Ces informations sont nécessaires pour rassurer les personnes concernées quant à la pertinence de l'essai pour la protection de la santé humaine et elles seront utiles dans le choix de la dose initiale appropriée.

▼B

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Toxicité orale aiguë: effets défavorables apparaissant après l'administration par voie orale d'une dose unique de substance ou de plusieurs doses données sur une période de 24 heures.

Mort différée: l'animal ne meurt ni n'apparaît moribond en l'espace de 48 heures, mais meurt ultérieurement au cours de la période d'observation de 14 jours.

Dose: la quantité de substance d'essai administrée. La dose s'exprime en poids de substance d'essai par unité de poids de l'animal d'expérience (par exemple mg/kg).

Toxicité manifeste: terme général désignant des signes évidents de toxicité qui surviennent à la suite de l'administration d'une substance d'essai [voir (3)]. Ces signes doivent être tels que l'on puisse s'attendre à ce qu'une augmentation de la dose administrée entraîne l'apparition de douleurs importantes et des signes persistants de détresse profonde, un état moribond [pour les critères, voir (8)] et probablement de la mortalité pour la plupart des animaux.

SGH: système général harmonisé de classification et d'étiquetage. Une activité conjointe de l'OCDE (santé humaine et environnement), du comité d'experts sur le transport des matières dangereuses (propriétés physico-chimiques) et du BIT (communication des dangers) et coordonnée par l'IOMC (Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals).

Mort imminente: il y a mort imminente lorsqu'on s'attend à ce qu'un état moribond ou la mort interviennent avant le prochain moment d'observation prévu. Les signes indicatifs de cet état chez les rongeurs comprennent les convulsions, la position latérale, la position couchée et les tremblements [voir (8) pour plus de détails].

DL_{50} (dose létale 50 %): dose unique d'une substance d'essai, obtenue par calcul statistique, susceptible d'entraîner la mort de 50 % des animaux lorsqu'elle est administrée par voie orale. La valeur de la DL_{50} est exprimée en poids de la substance par unité de poids corporel de l'animal d'expérience (mg/kg).

Dose limite: désigne une dose qui est la limite supérieure pour l'essai (2 000 ou 5 000 mg/kg).

État moribond: désigne l'état précédant la mort ou l'incapacité à survivre, même si un traitement est donné [pour de plus amples détails, voir (8)].

Mort prévisible: présence de signes cliniques indiquant que la mort va intervenir à un moment déterminé dans le futur, avant la fin projetée de l'expérience, par exemple incapacité à atteindre l'eau ou la nourriture [pour plus de détails, voir (8)].

▼B

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Des groupes d'animaux du même sexe reçoivent des doses prédéterminées de 5, 50, 300 et 2 000 mg/kg selon une procédure séquentielle. Exceptionnellement, une dose additionnelle de 5 000 mg/kg peut être envisagée (voir section 1.6.2). La dose initiale, choisie sur la base d'une étude d'orientation, est celle qui est susceptible de faire apparaître certains signes de toxicité, sans toutefois provoquer des effets toxiques graves ou la mort. Les manifestations cliniques et les effets associés à la douleur, à la souffrance et à une mort imminente sont décrits dans un document d'orientation de l'OCDE (8). D'autres groupes d'animaux reçoivent des doses plus fortes ou moins fortes en fonction de l'absence ou de la présence d'effets toxiques ou de mortalité. On continue la procédure jusqu'à ce que l'on identifie la dose qui occasionne un effet toxique évident ou la mort d'un seul animal. La procédure est également interrompue lorsque la dose la plus forte ne donne lieu à aucun effet observé ou lorsque la mort survient à la dose la plus faible.

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. **Choix de l'espèce animale**

Le rat est l'espèce préférée, mais d'autres espèces peuvent être utilisées. Normalement, on utilise des femelles (7). L'étude de la littérature sur les essais traditionnels de DL_{50} permet de conclure qu'il y a peu de différences de sensibilité entre sexes et que, lorsqu'il y a une différence, les femelles sont en général légèrement plus sensibles (10). Si, toutefois, compte tenu des propriétés toxicologiques et toxicocinétiques de composés structurellement voisins, il apparaît que les mâles sont probablement plus sensibles, il convient d'employer des mâles. Dans ce cas, il faut fournir une justification adéquate.

On utilise de jeunes animaux adultes sains issus de souches couramment utilisées en laboratoire. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. Au début de l'essai, chaque animal doit être âgé de 8 à 12 semaines et son poids doit se situer dans un intervalle de ± 20 % du poids moyen des animaux précédemment exposés.

1.4.2. **Conditions d'hébergement et d'alimentation**

La température du local des animaux d'expérience doit être maintenue à 22 °C (± 3 °C). L'humidité relative doit atteindre au moins 30 % et rester de préférence inférieure à 70 %, mais en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 %. On appliquera un éclairage artificiel alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Pour l'alimentation des animaux, on peut utiliser la nourriture classique de laboratoire avec de l'eau potable à satiété. Les animaux peuvent être groupés par dose. Toutefois, le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal.

1.4.3. **Préparation des animaux**

Les animaux sont choisis au hasard, marqués pour permettre une identification individuelle et gardés dans leurs cages pour les acclimater aux conditions de laboratoire pendant au moins cinq jours avant l'expérience.

▼B

1.4.4. **Préparation des doses**

En général, il convient d'administrer la substance d'essai à volume constant quelle que soit la dose testée, en faisant varier la concentration de la préparation. Lorsqu'un produit liquide ou un mélange font l'objet de l'essai, l'utilisation du produit non dilué, donc à concentration constante, peut être plus appropriée pour l'évaluation du risque de cette substance. Certaines autorités réglementaires l'exigent. Dans tous les cas, il ne faut pas dépasser le volume de dose maximal. Le volume maximal de liquide qui peut être administré en une seule fois dépend de la taille de l'animal d'essai. Chez les rongeurs, ce volume ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas de solutions aqueuses pour lesquelles on peut utiliser 2 ml/100 g de poids corporel. Il est recommandé d'utiliser une solution aqueuse chaque fois que cela est possible, sinon on peut utiliser une solution dans de l'huile (par exemple de l'huile de maïs) et éventuellement une solution dans d'autres véhicules. En ce qui concerne les véhicules non aqueux, leur toxicité doit être connue. Les doses doivent être préparées juste avant l'administration, sauf si la stabilité de la préparation pendant la durée de la période d'utilisation est connue et jugée acceptable.

1.5. MODE OPÉRATOIRE

1.5.1. **Administration des doses**

La substance d'essai est administrée en une seule dose par gavage à l'aide d'une sonde gastrique ou de toute autre canule pour intubation appropriée. Lorsqu'il n'est pas possible d'administrer la dose en une seule fois, celle-ci peut être fractionnée sur une période n'excédant pas 24 heures.

Les animaux doivent être à jeun avant l'administration de la substance (on supprimera la nourriture, mais pas l'eau, pendant toute une nuit pour les rats et pendant 3 à 4 heures pour les souris). Après la période de jeûne, les animaux doivent être pesés; la substance d'essai leur est ensuite administrée. Après l'administration de la substance, les animaux peuvent être à nouveau privés de nourriture, pendant 3 à 4 heures pour les rats et pendant 1 à 2 heures pour les souris. Si la dose est administrée par fractions sur un certain laps de temps, il peut s'avérer nécessaire, en fonction de la durée du traitement, d'alimenter et de faire boire les animaux.

1.5.2. **Étude d'orientation**

Le but de l'étude d'orientation est de permettre la sélection d'une dose initiale appropriée pour l'étude principale. L'administration des doses se fait de façon séquentielle aux animaux individuellement selon les schémas de l'annexe 1. L'étude d'orientation prend fin lorsqu'une décision au sujet de la dose initiale de l'étude principale peut être prise (ou lorsqu'une mortalité est observée à la dose prédéterminée la plus faible).

Pour la dose initiale de l'étude d'orientation, on choisit un niveau parmi les suivants: 5, 50, 300 et 2 000 mg/kg. Le niveau choisi est celui pour lequel on peut s'attendre à observer des signes de toxicité évidente, si possible sur la base d'indications obtenues à partir de données in vivo et in vitro sur la même substance et sur des substances structurellement voisines. En l'absence de telles informations, la dose initiale sera de 300 mg/kg.

Les animaux sont traités à 24 heures d'intervalle au moins. Tous les animaux sont observés pendant au moins quatorze jours.

▼B

Exceptionnellement, et uniquement lorsque cela est nécessaire pour satisfaire à une exigence réglementaire particulière, l'utilisation d'une dose maximale prédéterminée supplémentaire de 5 000 mg/kg peut être envisagée (voir annexe 3). Par souci de protection des animaux, l'essai de substances en catégorie 5 du SGH (2 000 - 5 000 mg/kg) est déconseillé et ne doit être envisagé que lorsqu'il est très probable qu'il donnera des résultats qui présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé des hommes et des animaux ou de l'environnement.

Dans le cas où un animal ayant reçu la dose prédéterminée la plus faible (5 mg/kg) mourrait au cours de l'étude d'orientation, la procédure normale est de terminer l'étude et de classer la substance en catégorie 1 du SGH (voir l'annexe 1). Cependant, il peut s'avérer nécessaire de confirmer la classification, et la procédure facultative supplémentaire ci-après est alors proposée. Un deuxième animal reçoit une dose de 5 mg/kg. Si ce deuxième animal meurt, la classification en catégorie 1 du SGH est confirmée et l'étude prend fin immédiatement. Si le deuxième animal survit, un maximum de trois animaux supplémentaires reçoivent chacun 5 mg/kg. Étant donné le risque de mortalité élevé, il convient de procéder de manière séquentielle par souci de protection des animaux. L'intervalle de temps entre chaque administration doit être suffisant afin de pouvoir démontrer que l'animal précédent a des chances de survivre. Si un deuxième animal meurt, l'administration séquentielle sera immédiatement arrêtée et aucun autre animal ne recevra de dose. Avec la mort d'un deuxième animal (indépendamment du nombre d'animaux soumis à l'essai au moment où celui-ci est arrêté), le résultat est A (2 morts ou plus), et la règle de classification présentée à l'annexe 2 pour la dose prédéterminée de 5 rng/kg s'applique: catégorie 1 s'il y a 2 morts ou plus, et catégorie 2 s'il y a seulement 1 mort. En outre, l'annexe 4 propose une méthode de classification selon le système communautaire en attendant la mise en place du nouveau SGH.

1.5.3. **Étude principale**

1.5.3.1. *Nombre d'animaux et niveaux des doses*

Les schémas de l'annexe 2 indiquent la marche à suivre après administration de la dose initiale. Il y a trois possibilités: arrêter l'essai et attribuer la classification appropriée, administrer la dose prédéterminée supérieure ou administrer la dose inférieure. Cependant, par souci de protection des animaux, les doses ayant entraîné la mort au cours de l'étude d'orientation ne sont pas réappliquées lors de l'étude principale (voir annexe 2). L'expérience démontre que le résultat le plus probable à la dose initiale est que la substance pourra être classée et qu'il sera inutile de prolonger l'essai.

En général, on utilise au total cinq animaux du même sexe à chaque niveau de dose étudié. Ce groupe de cinq animaux est constitué de l'animal utilisé dans l'étude d'orientation, auquel est administrée la dose sélectionnée, et de quatre animaux supplémentaires (sauf dans les rares cas où une dose utilisée dans l'étude principale n'a pas été utilisée dans l'étude d'orientation).

L'intervalle de temps à respecter entre l'administration de chaque niveau de dose dépend du moment où se manifestent les effets toxiques, de leur durée et de leur gravité. L'administration de la dose suivante doit être retardée jusqu'à ce que l'on ait obtenu la certitude que les animaux précédemment soumis au traitement vont survivre. Un laps de temps de 3 ou 4 jours entre les administrations à chaque niveau de dose est recommandé, si nécessaire, pour permettre l'observation de signes de toxicité différée. Cet intervalle peut être ajusté selon qu'il convient, par exemple, en cas de réponse peu concluante.

▼B

Lorsque l'on envisage d'utiliser une dose prédéterminée maximale de 5 000 mg/kg, il y a lieu de suivre la procédure présentée à l'annexe 3 (voir également section 1.6.2).

1.5.3.2. *Essai limite*

L'essai limite est utilisé principalement lorsque l'expérimentateur dispose d'informations indiquant que la substance d'essai n'est probablement pas toxique, c'est-à-dire que sa toxicité ne se manifeste qu'au-delà des doses limites réglementaires. Des informations concernant la toxicité de la substance d'essai peuvent être déduites des connaissances acquises sur des substances, produits ou mélanges similaires déjà testés, compte tenu de l'identité et du pourcentage des composants importants sur le plan toxicologique. Quand on ne dispose pas d'informations concernant la toxicité de la substance, ou lorsqu'on s'attend à une substance toxique, il faut effectuer l'essai principal.

Selon la procédure normale, une étude d'orientation à la dose initiale de 2 000 mg/kg (exceptionnellement 5 000 mg/kg), suivie du traitement de quatre animaux supplémentaires à cette même dose, sert d'essai limite dans cette ligne directrice.

1.6. OBSERVATIONS

Les animaux doivent être observés individuellement au moins une fois pendant les 30 premières minutes suivant l'administration de la substance et régulièrement pendant les premières 24 heures, avec une attention particulière au cours des 4 premières heures; l'observation doit ensuite être quotidienne, pendant 14 jours en tout, sauf dans le cas des animaux qui meurent en cours d'étude ou qui doivent être retirés de l'étude et euthanasiés pour leur épargner des souffrances excessives. Toutefois, la durée d'observation ne doit pas être fixée de manière rigide. Elle doit être fonction des réactions de toxicité, du moment où elles apparaissent et de la durée de la période de récupération. Elle peut donc être prolongée si nécessaire. Les moments où les signes de toxicité apparaissent et disparaissent sont importants, surtout si les effets toxiques ont tendance à être différés (11). Toutes les observations sont enregistrées de façon systématique, une fiche individuelle étant établie pour chaque animal.

D'autres observations peuvent s'avérer nécessaires lorsque les animaux continuent à manifester des signes de toxicité. Les observations doivent porter sur les modifications de la peau, des poils, des yeux et des muqueuses, ainsi que de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux central et autonome, de l'activité somatomotrice et du comportement. L'attention portera en particulier sur l'observation des diverses manifestations de tremblement, convulsions, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil et coma. Les principes et critères résumés dans le document d'orientation sur les effets sur l'homme doivent être pris en considération (8). Les animaux moribonds et les animaux souffrant manifestement ou présentant des signes graves de détresse doivent être euthanasiés. Qu'il s'agisse d'animaux euthanasiés pour raisons éthiques ou d'animaux retrouvés morts, le moment de la mort doit être enregistré de façon aussi précise que possible.

1.6.1. **Poids corporel**

Le poids de chaque animal doit être déterminé peu de temps avant l'administration de la substance d'essai et au moins une fois par semaine ensuite. Les variations de poids doivent être calculées et enregistrées. À la fin de l'essai, les animaux survivants sont pesés puis euthanasiés.

▼B

1.6.2. **Pathologie**

Tous les animaux d'essai (y compris ceux qui sont morts au cours de l'essai ou ceux qui ont été retirés de l'étude pour des raisons éthiques) doivent être soumis à une autopsie à l'échelle macroscopique. Pour chaque animal, toutes les altérations pathologiques macroscopiques doivent être enregistrées. Chez les animaux qui survivent 24 heures ou plus après administration de la dose initiale, l'examen microscopique des organes présentant des signes évidents de pathologie doit également être envisagé, car il peut fournir des renseignements utiles.

2. **RÉSULTATS**

Les résultats obtenus pour chaque animal doivent être présentés. Toutes les données doivent être résumées dans un tableau indiquant, pour chaque groupe d'essai, le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts pendant l'essai ou sacrifiés pour des raisons éthiques, et pour chaque animal, le moment de la mort, la description des effets toxiques et leur évolution dans le temps ainsi que leur réversibilité éventuelle et les résultats de l'autopsie.

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir, s'il y a lieu, les renseignements suivants:

Substance d'essai:

— état physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (compris isomérisation),

— données relatives à l'identification, y compris numéro CAS.

Véhicule (le cas échéant):

— justification du choix du véhicule, s'il ne s'agit pas d'eau.

Animaux d'essai:

— espèce/souche utilisée,

— état microbiologique des animaux, s'il est connu,

— nombre, âge et sexe des animaux (le cas échéant, justification du choix de mâles à la place de femelles),

— origine, conditions d'hébergement, régime alimentaire, etc.

Conditions de l'essai:

— détails sur la formulation de la substance d'essai, notamment état physique du produit administré,

— détails sur le mode d'administration, notamment volume des doses et moment de l'administration,

— détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (y compris le type de régime et sa provenance ainsi que celle de l'eau),

— justification du choix de la dose initiale.

▼B

Résultats:

— tableau des réactions aux différentes doses pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris mortalité, nature, gravité et durée des effets),

— tableau des poids corporels et des variations du poids,

— poids individuel des animaux le jour du traitement, et ensuite à intervalles d'une semaine, et au moment de la mort ou du sacrifice,

— date et heure de la mort si celle-ci intervient avant le moment prévu du sacrifice,

— pour chaque animal, moment d'apparition et évolution des signes de toxicité et réversibilité éventuelle,

— pour chaque animal, résultats de l'autopsie et observations histopathologiques.

Discussion et interprétation des résultats.

Conclusions.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, p. 85-92.

(2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, p. 279-291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD_{50} test. Fd. Chem. Toxicol. 28, p. 469-482.

(4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, p. 313-324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315-323. Human Exptl. Toxicol.

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. Hum. Exp. Toxicol., 21, p. 183-196.

(7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. Paris

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19.

▼B

(9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

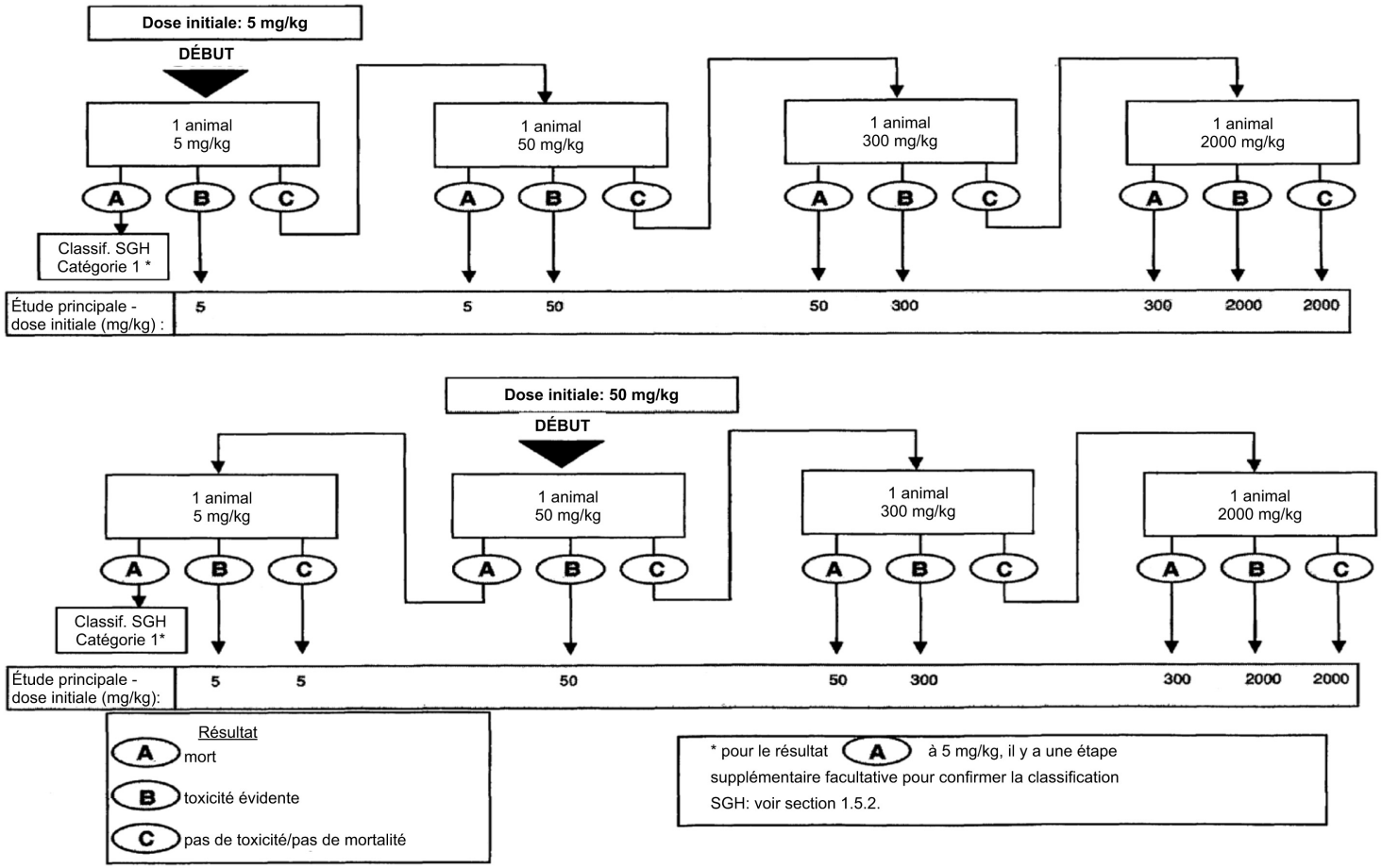
(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L, Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, p. 223-231.

(11) Chan, P.K and A.W. Hayes (1994). Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation in: Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

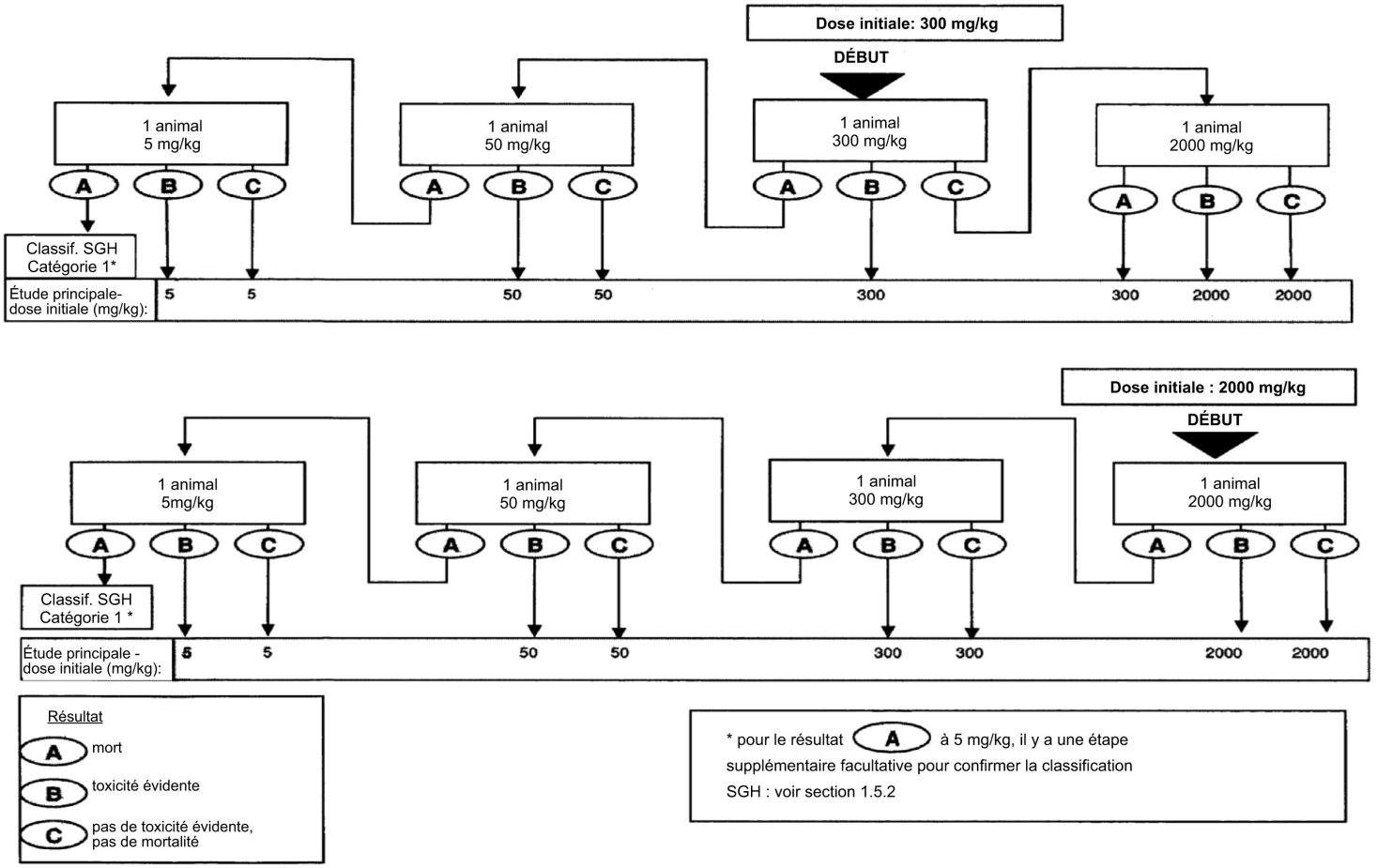
▼B

ANNEXE 1

SCHÉMA POUR L'ÉTUDE D'ORIENTATION



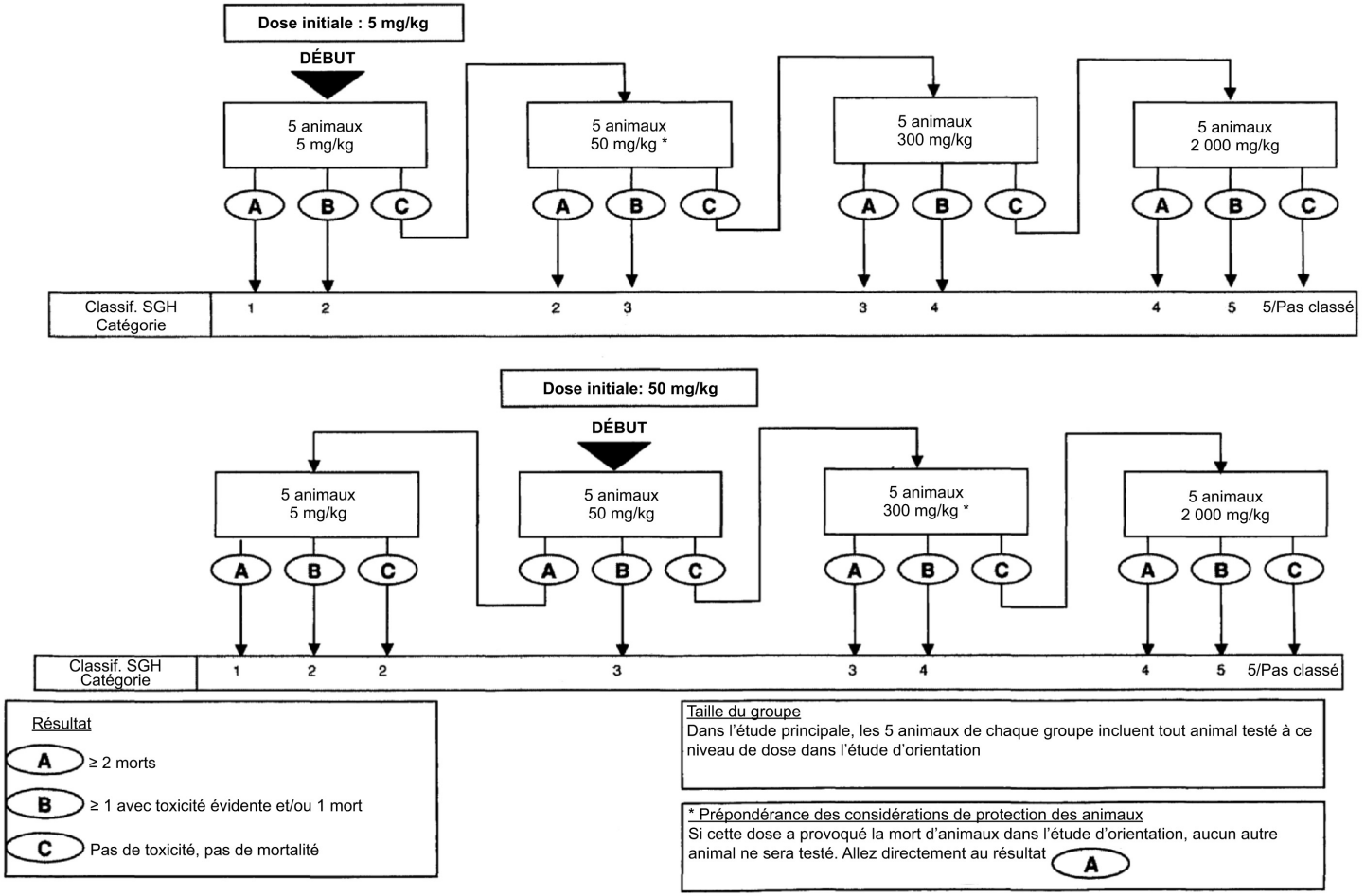
▼B

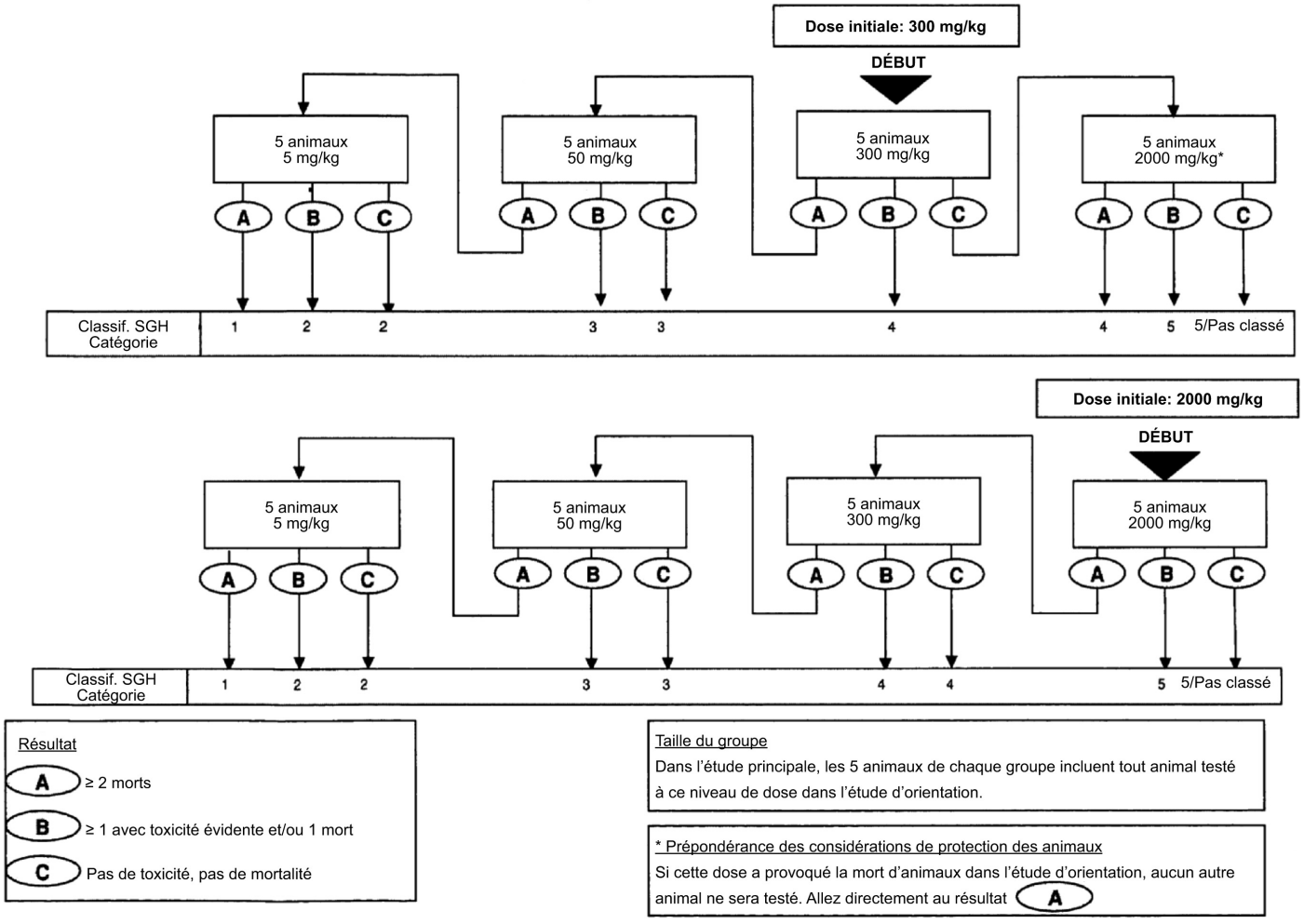

Dose initiale: 300 mg/kg
DÉBUT
1 animal 5 mg/kg
1 animal 50 mg/kg
1 animal 300 mg/kg
1 animal 2000 mg/kg
A B C
Classif. SGH Catégorie 1*
Étude principale- dose initiale (mg/kg):
5 5 50 50 300 300 2000 2000
Dose initiale : 2000 mg/kg
DÉBUT
1 animal 5mg/kg
1 animal 50 mg/kg
1 animal 300 mg/kg
1 animal 2000 mg/kg
Classif. SGH Catégorie 1 *
Étude principale - dose initiale (mg/kg):
5 5 50 50 300 300 2000 2000
Résultat
A mort
B toxicité évidente
C pas de toxicité évidente, pas de mortalité
* pour le résultat A à 5 mg/kg, il y a une étape supplémentaire facultative pour confirmer la classification SGH : voir section 1.5.2

▼B

ANNEXE 2

SCHÉMA POUR L'ÉTUDE PRINCIPALE




Dose initiale: 300 mg/kg
DÉBUT
5 animaux 5 mg/kg
5 animaux 50 mg/kg
5 animaux 300 mg/kg
5 animaux 2000 mg/kg*
A B C
Classif. SGH Catégorie
1 2 2 3 3 4 4 5 5/Pas classé
Dose initiale: 2000 mg/kg
DÉBUT
5 animaux 5 mg/kg
5 animaux 50 mg/kg
5 animaux 300 mg/kg
5 animaux 2000 mg/kg
A B C
Classif. SGH Catégorie
1 2 2 3 3 4 4 5 5/Pas classé
Résultat
A ≥ 2 morts
B ≥ 1 avec toxicité évidente et/ou 1 mort
C Pas de toxicité, pas de mortalité
Taille du groupe
Dans l'étude principale, les 5 animaux de chaque groupe incluent tout animal testé à ce niveau de dose dans l'étude d'orientation.
* Prépondérance des considérations de protection des animaux
Si cette dose a provoqué la mort d'animaux dans l'étude d'orientation, aucun autre animal ne sera testé. Allez directement au résultat A

▼B

ANNEXE 3

CRITÈRES POUR LA CLASSIFICATION DE SUBSTANCES D'ESSAI DONT ON PRÉSUME QUE LA DL_{50} EST SUPÉRIEURE À 2 000 mg/kg, SANS RECOURIR À L'ESSAI

Les critères pour la catégorie de danger 5 sont destinés à permettre l'identification de substances qui ont une toxicité aiguë relativement faible mais qui, dans certaines conditions, peuvent se révéler dangereuses pour des populations vulnérables. Ces substances sont présumées avoir une DL_{50} orale ou cutanée comprise dans la plage 2 000 - 5 000 mg/kg ou correspondant à des doses équivalentes par d'autres voies. Des substances d'essai peuvent être classées dans la catégorie SGH de danger 5, définie par 2 000 mg/kg < DL_{50} < 5 000 mg/kg, dans les cas suivants:

a) lorsque, en fonction de la mortalité, l'un des schémas de l'annexe 2 oriente la substance vers cette catégorie;

b) lorsque l'on est déjà en possession de données fiables indiquant que la DL_{50} se situera dans la plage des valeurs de la catégorie 5; ou lorsque d'autres études sur des animaux ou l'observation d'effets toxiques chez l'homme suscitent de sérieuses inquiétudes pour la santé humaine;

c) par extrapolation, évaluation ou mesure de données, lorsque la classification dans une catégorie de plus grand danger n'est pas justifiée, et

   — il existe des informations fiables faisant état d'effets toxiques significatifs chez l'homme, ou

   — une certaine mortalité est observée en testant par voie orale jusqu'aux valeurs de la catégorie 4, ou

   — lorsqu'un jugement d'expert confirme l'existence de signes cliniques significatifs de toxicité lors d'un essai mené jusqu'aux valeurs de la catégorie 4, hormis diarrhée, hérissement des poils ou aspect mal soigné, ou

   — quand un jugement d'expert confirme l'existence d'informations fiables indiquant la possibilité d'effets aigus significatifs d'après les résultats des autres études sur animaux.

ESSAIS À DOSES SUPÉRIEURES À 2 000 mg/kg

Exceptionnellement, et uniquement lorsque cela est nécessaire pour satisfaire à une exigence réglementaire particulière, l'utilisation d'une dose maximale supplémentaire de 5 000 mg/kg peut être envisagée. Par souci de protection des animaux, l'essai de substances à la dose de 5 000 mg/kg est déconseillé et ne devrait être envisagé que lorsqu'il est fort probable que les résultats d'un tel essai présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé des hommes et des animaux (9).

Étude d'orientation

Les critères de décision de la procédure séquentielle présentée à l'annexe 1 sont étendus de manière à s'appliquer également à une dose de 5 000 mg/kg. Ainsi, lorsqu'une dose initiale de 5 000 mg/kg est utilisée dans l'étude d'orientation et que le résultat A (mortalité) est obtenu, il faut tester un deuxième animal à 2 000 mg/kg; si le premier résultat est B ou C (toxicité évidente ou pas de toxicité), on pourra choisir 5 000 mg/kg comme dose initiale dans l'étude principale. De même, si on choisit une dose initiale différente de 5 000 mg/kg, l'essai se poursuivra à la dose de 5 000 mg/kg en cas d'obtention d'un résultat B ou C à 2 000 mg/kg. L'obtention d'un nouveau résultat A à 5 000 mg/kg imposera une dose initiale de 2 000 mg/kg pour l'étude principale, alors qu'un résultat B ou C imposera 5 000 mg/kg comme dose initiale pour cette étude.

▼B

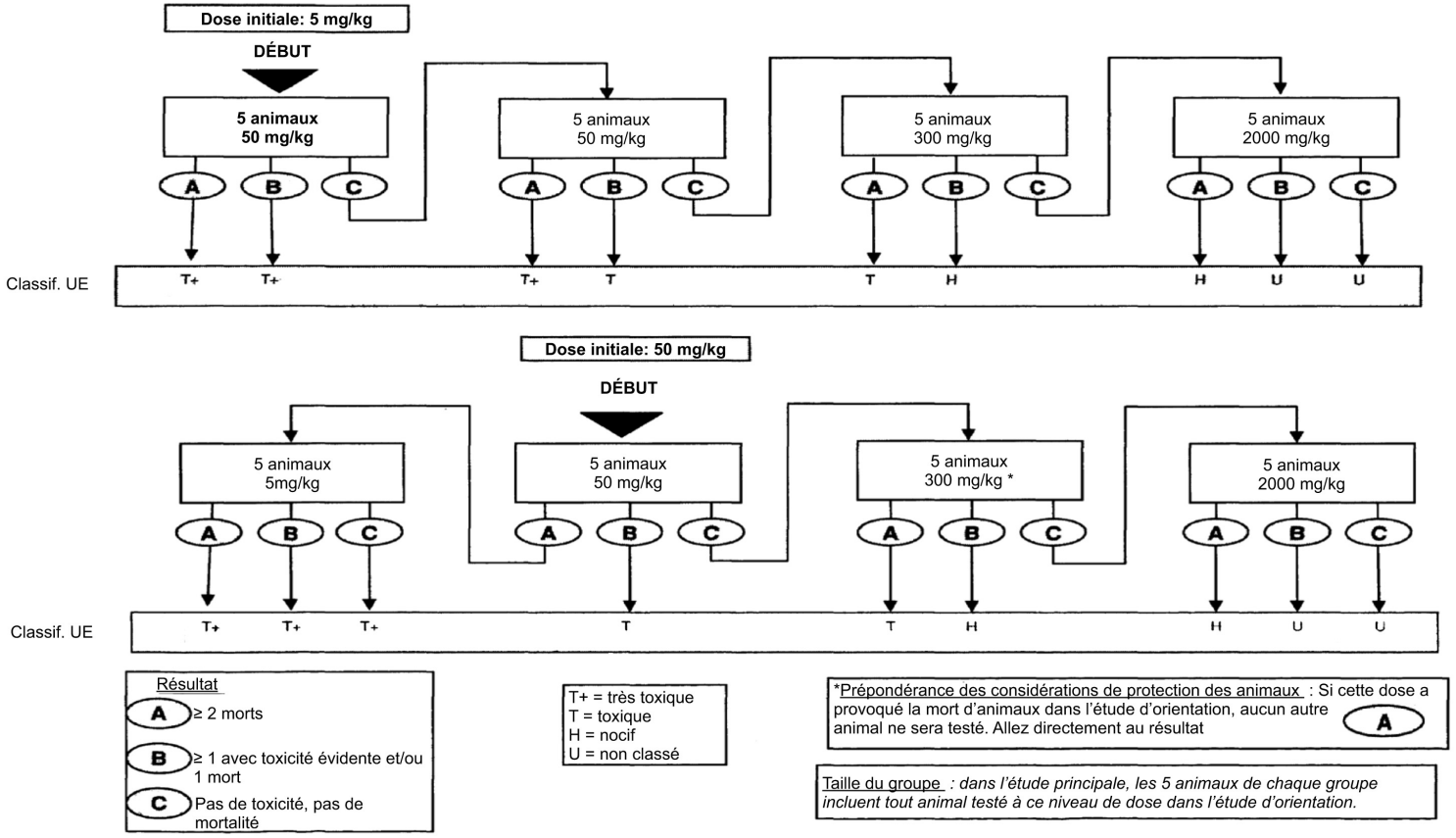
Étude principale

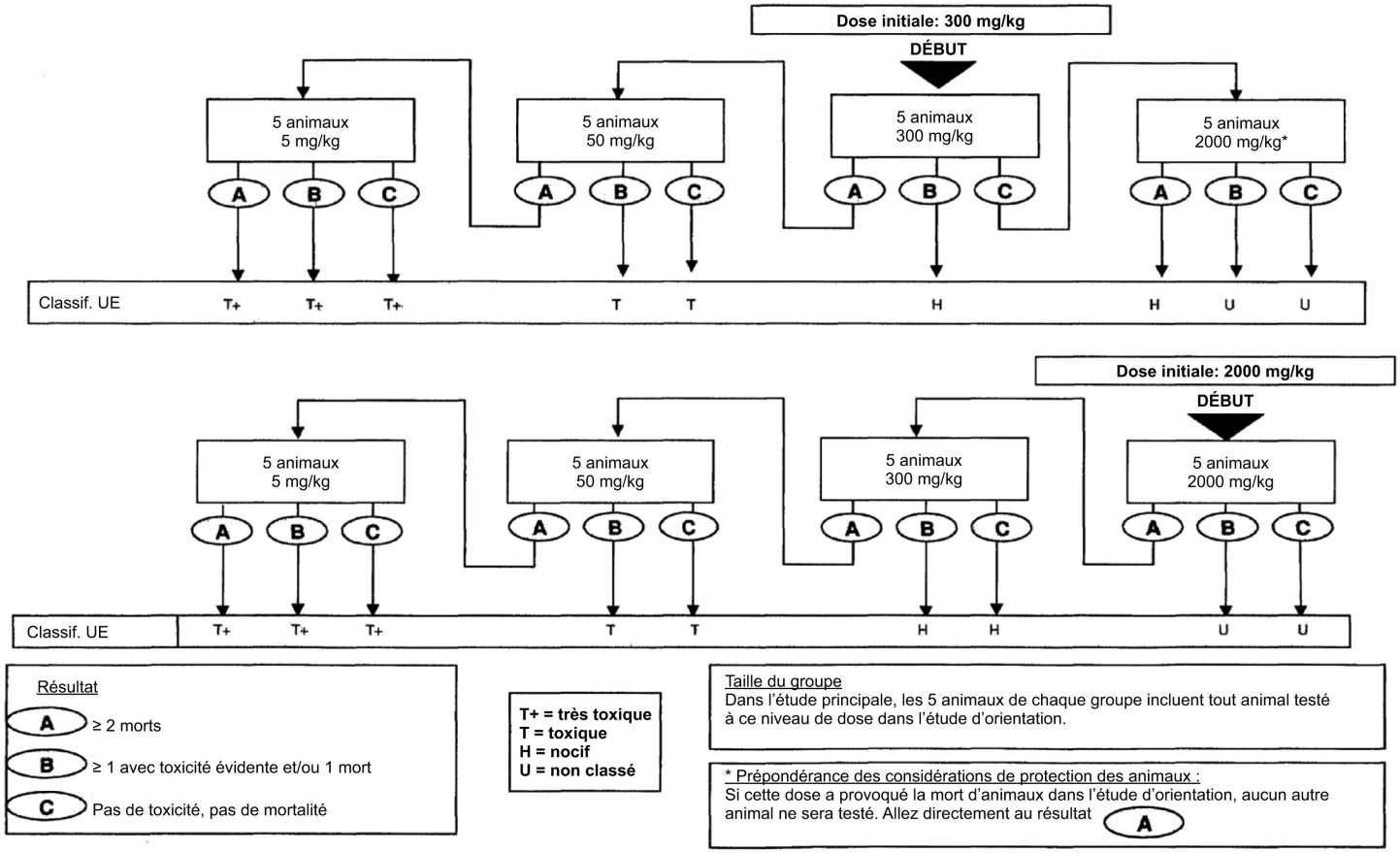
Les critères de décision de la procédure séquentielle présentée à l'annexe 2 sont étendus de manière à s'appliquer également à une dose de 5 000 mg/kg. Ainsi, lorsqu'une dose initiale de 5 000 mg/kg est utilisée dans l'étude principale et que le résultat A (> 2 morts) est obtenu, il faut tester un second groupe à 2 000 mg/kg. Si le premier résultat est B (toxicité évidente et/ou ≤ 1 mort) ou C (pas de toxicité), la substance ne sera pas classée dans le cadre du SGH. De façon similaire, si une dose initiale différente de 5 000 mg/kg est choisie, l'essai se poursuivra à la dose de 5 000 mg/kg en cas d'obtention d'un résultat C à 2 000 mg/kg. L'obtention d'un nouveau résultat A à 5 000 mg/kg entraînera la classification de la substance dans la catégorie 5 du SGH; si le résultat obtenu est B ou C, la substance ne sera pas classée dans le cadre du SGH.

ANNEXE 4

MÉTHODE D'ESSAI B.1 *bis*

Conseils pour une classification selon le système de l'UE en attendant la mise en place effective du système général harmonisé de classification (SGH) [voir référence (8)]




Dose initiale: 300 mg/kg
DÉBUT
5 animaux 5 mg/kg
5 animaux 50 mg/kg
5 animaux 300 mg/kg
5 animaux 2000 mg/kg*
A B C
Classif. UE
T+ T+ T+ T T H H U U
Dose initiale: 2000 mg/kg
DÉBUT
5 animaux 5 mg/kg
5 animaux 50 mg/kg
5 animaux 300 mg/kg
5 animaux 2000 mg/kg
A B C
Classif. UE
T+ T+ T+ T T H H U U
Résultat
A ≥ 2 morts
B ≥ 1 avec toxicité évidente et/ou 1 mort
C Pas de toxicité, pas de mortalité
T+ = très toxique
T = toxique
H = nocif
U = non classé
Taille du groupe
Dans l'étude principale, les 5 animaux de chaque groupe incluent tout animal testé à ce niveau de dose dans l'étude d'orientation.
* Prépondérance des considérations de protection des animaux :
Si cette dose a provoqué la mort d'animaux dans l'étude d'orientation, aucun autre animal ne sera testé. Allez directement au résultat A

▼B

B.1 ter. **TOXICITÉ ORALE AIGUË — MÉTHODE DE LA CLASSE DE TOXICITÉ AIGUË**

1. **MÉTHODE**

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 423 (2001) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La méthode de la classe de toxicité aiguë (1) décrite dans cet essai est une procédure séquentielle qui utilise trois animaux de même sexe à chaque étape. Suivant la mortalité et/ou l'état moribond des animaux, deux à quatre étapes sont en moyenne nécessaires pour évaluer la toxicité aiguë de la substance d'essai. Cette procédure est reproductible, utilise très peu d'animaux et permet de classer des substances par ordre de toxicité de la même manière que les autres méthodes de toxicité aiguë. La méthode par classe de toxicité aiguë est fondée sur des évaluations biométriques (2) (3) (4) (5) avec des doses prédéterminées, convenablement espacées de manière à permettre le classement des substances les unes par rapport aux autres aux fins de l'évaluation des dangers. La méthode, telle qu'elle a été adoptée en 1996, a été largement validée in vivo par rapport aux données de DL_{50} issues de la littérature, tant sur le plan national (6) que sur le plan international (7).

Des indications permettant de choisir la méthode d'essai la plus appropriée pour un but donné sont présentées dans le document d'orientation sur les essais de toxicité orale aiguë (8). Ce document contient également de plus amples informations sur la conduite et l'interprétation de la méthode d'essai B.1 *ter*.

Il n'est pas nécessaire d'administrer des substances d'essai à des niveaux de dose dont on sait qu'elles provoquent des douleurs et une détresse importante du fait des propriétés corrosives ou sévèrement irritantes. Au cours de l'essai, les animaux moribonds et les animaux souffrant de façon manifeste ou montrant des signes de détresse grave devront être euthanasiés. Ces animaux devront être pris en compte dans l'interprétation des résultats, au même titre que les animaux morts pendant l'essai. Les critères pour décider de tuer les animaux moribonds et ceux qui souffrent de façon manifeste ainsi que des orientations pour reconnaître une mort prévisible ou imminente font l'objet d'un autre document d'orientation (9).

La méthode utilise des doses prédéterminées et donne des résultats qui permettent le classement des substances selon le système général harmonisé de classification (SGH) des substances ayant une toxicité aiguë (10).

En principe, la méthode ne vise pas à calculer une valeur précise de DL_{50}, mais elle permet de déterminer dans quelle gamme de doses la substance doit être considérée comme létale, puisque la mort d'une partie des animaux reste le principal effet observé dans cet essai. La méthode permet de déterminer une DL_{50} uniquement dans le cas où au moins deux doses donnent une mortalité supérieure à 0 % et inférieure à 100 %. Grâce à l'utilisation d'un choix de doses prédéterminées, indépendamment de la substance d'essai, et au lien explicite entre classification et nombre d'animaux dans différents états observés, la cohérence entre laboratoires est favorisée.

▼B

Le laboratoire doit rassembler toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de procéder à l'essai. Ces informations comprennent l'identité et la structure chimique de la substance, ses propriétés physico-chimiques, le résultat de tout autre essai de toxicité réalisé in vivo ou in vitro sur la substance, les données toxicologiques concernant des substances structurellement apparentées, ainsi que le ou les usages escomptés de la substance. Ces informations sont nécessaires pour rassurer les personnes concernées quant à la pertinence de l'essai pour la protection de la santé humaine et elles seront utiles dans le choix de la dose initiale appropriée.

1.2. DÉFINITIONS

Toxicité orale aiguë: effets défavorables apparaissant après l'administration par voie orale d'une dose unique de substance ou de plusieurs doses données sur une période de 24 heures.

Mort différée: l'animal ne meurt ni n'apparaît moribond en l'espace de 48 heures, mais meurt ultérieurement au cours de la période d'observation de 14 jours.

Dose: la quantité de substance d'essai administrée. La dose s'exprime en poids de substance d'essai par unité de poids de l'animal d'expérience (par exemple mg/kg).

SGH: système général harmonisé de classification et d'étiquetage. Une activité conjointe de l'OCDE (santé humaine et environnement), du comité d'experts sur le transport des matières dangereuses (propriétés physico-chimiques) et du BIT (communication des dangers) et coordonnée par l'IOMC (Interorganisation Program for the Sound Management of Chemicals).

Mort imminente: il y a mort imminente lorsqu'on s'attend à ce qu'un état moribond ou la mort interviennent avant le prochain moment d'observation prévu. Parmi les signes qui sont indicatifs de cet état chez les rongeurs, il y a les convulsions, la position latérale, la position couchée et les tremblements [pour de plus amples détails, voir (9)].

DL_{50} (dose orale létale 50 %): dose unique d'une substance d'essai, obtenue par calcul statistique, susceptible d'entraîner la mort de 50 % des animaux lorsqu'elle est administrée par voie orale. La valeur de la DL_{50} est exprimée en poids de la substance d'essai par unité de poids corporel de l'animal d'expérience (mg/kg).

Dose limite: désigne une dose qui est la limite supérieure pour l'essai (2 000 ou 5 000 mg/kg).

État moribond: l'état avant la mort ou l'incapacité à survivre, même si un traitement est donné [pour de plus amples détails, voir (9)].

Mort prévisible: présence de signes cliniques indiquant que la mort va intervenir à un moment déterminé dans le futur, avant la fin projetée de l'expérience, par exemple incapacité à atteindre l'eau ou la nourriture [pour plus de détails, voir (9)].

▼B

1.3. PRINCIPE DE L'ESSAI

Le principe de cet essai est que, avec un processus séquentiel et un nombre minimal d'animaux par étape, il est possible d'obtenir des informations sur la toxicité aiguë de la substance d'essai qui sont suffisantes aux fins de sa classification. Une dose déterminée de la substance est administrée par voie orale à un groupe d'animaux. La substance est testée selon une procédure séquentielle utilisant trois animaux de même sexe (généralement des femelles) à chaque étape. L'absence ou la manifestation de mortalité liée à la substance dans un groupe ayant reçu une dose à une étape donnée détermine l'étape suivante, c'est-à-dire:

— arrêt de l'essai,

— administration de la même dose à trois animaux supplémentaires,

— administration de la dose immédiatement supérieure ou immédiatement inférieure à trois animaux supplémentaires.

Des détails concernant le mode opératoire sont décrits à l'annexe 1. La méthode permet de se prononcer sur la classification de la substance d'essai dans une classe de toxicité délimitée par des valeurs préalablement fixées de DL_{50}.

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.4.1. **Choix de l'espèce animale**

Le rat est l'espèce préférée mais d'autres espèces de rongeurs peuvent être utilisées. Normalement, on utilise des femelles (9). L'étude de la littérature sur les essais traditionnels de DL_{50} montre en effet qu'il y a peu de différence de sensibilité entre sexes et que, lorsqu'il y a des différences, les femelles sont en général légèrement plus sensibles (11). Si, toutefois, compte tenu des propriétés toxicologiques et toxicocinétiques de composés structurellement voisins, il apparaît que les mâles sont probablement plus sensibles, il convient d'employer des mâles. Dans ce cas, il faut fournir une justification adéquate.

On utilise de jeunes animaux adultes sains, issus de souches couramment utilisées en laboratoire. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. Au début de l'essai, chaque animal doit être âgé de 8 à 12 semaines et son poids doit se situer dans un intervalle de ± 20 % du poids moyen des animaux précédemment exposés.

1.4.2. **Conditions d'hébergement et d'alimentation**

La température du local des animaux d'expérience doit être de 22 °C (± 3 °C). L'humidité relative doit atteindre au moins 30 % et rester de préférence inférieure à 70 %, mais en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 %. On appliquera un éclairage artificiel alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Pour l'alimentation des animaux, on peut utiliser la nourriture classique de laboratoire avec de l'eau potable à satiété. Les animaux peuvent être groupés par dose. Toutefois, le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal.

▼B

1.4.3. **Préparation des animaux**

Les animaux sont choisis au hasard, marqués pour permettre une identification individuelle et gardés dans leurs cages pour les acclimater aux conditions de laboratoire pendant au moins cinq jours avant l'expérience.

1.4.4. **Préparation des doses**

En général, il convient d'administrer la substance d'essai à volume constant quelle que soit la dose testée, en faisant varier la concentration de la préparation. Lorsqu'un produit liquide ou un mélange font l'objet de l'essai, l'utilisation du produit non dilué, donc à concentration constante, peut être plus appropriée pour l'évaluation du risque de cette substance. Certaines autorités réglementaires l'exigent. Dans tous les cas, il ne faut pas dépasser le volume de dose maximal. Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une seule fois dépend de la taille de l'animal d'essai. Chez les rongeurs, ce volume ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas de solutions aqueuses pour lesquelles on peut utiliser 2 ml/100 g de poids corporel. Il est recommandé d'utiliser une solution aqueuse chaque fois que cela est possible, sinon on peut utiliser une solution dans de l'huile (par exemple de l'huile de mais) et éventuellement une solution dans d'autres véhicules. En ce qui concerne les véhicules non aqueux, leur toxicité doit être connue. Les doses doivent être préparées juste avant l'administration, sauf si la stabilité de la préparation pendant la durée de la période d'utilisation est connue et jugée acceptable.

1.5. MODE OPÉRATOIRE

1.5.1. **Administration des doses**

La substance d'essai est administrée en une seule dose en utilisant une sonde gastrique ou toute autre canule pour intubation appropriée. Lorsqu'il n'est pas possible d'administrer la dose en une seule fois, celle-ci peut être fractionnée sur une période n'excédant pas 24 heures.

Les animaux doivent être à jeun avant l'administration de la substance (on supprimera la nourriture, mais pas l'eau, pendant toute une nuit pour les rats et pendant 3 à 4 heures pour les souris). Après la période de jeûne, les animaux doivent être pesés; la substance d'essai leur est ensuite administrée. Après l'administration de la substance, les animaux peuvent être à nouveau privés de nourriture, pendant 3 à 4 heures pour les rats et pendant 1 à 2 heures pour les souris. Si la dose est administrée par fractions sur un certain laps de temps, il peut s'avérer nécessaire, en fonction de la durée du traitement, d'alimenter et de faire boire les animaux.

1.5.2. **Nombre d'animaux et niveaux des doses**

Trois animaux sont utilisés à chaque étape. Pour la dose initiale, on choisit un niveau parmi les quatre suivants: 5, 50, 300 et 2 000 mg/kg de poids corporel. Le niveau choisi est celui pour lequel on peut s'attendre à observer une mortalité chez les animaux traités. Les schémas de l'annexe 1 décrivent la marche à suivre pour chacune des doses initiales. En outre, l'annexe 4 propose une méthode de classification selon le système communautaire en attendant la mise en place du nouveau SGH.

▼B

Lorsque certaines informations donnent à penser qu'il est peu probable que la dose initiale la plus élevée (2 000 mg/kg de poids corporel) provoque une mortalité, il convient de procéder à un essai limite. En l'absence de telles informations sur la substance d'essai, la dose initiale qui est recommandée par souci de protection des animaux est 300 mg/kg de poids corporel.

L'intervalle de temps à respecter entre l'administration de chaque niveau de dose dépend du moment où se manifestent les effets toxiques, de leur durée et de leur gravité. L'administration de la dose suivante doit être retardée jusqu'à ce que l'on ait obtenu la certitude que les animaux précédemment soumis au traitement vont survivre.

Exceptionnellement, et uniquement lorsque cela est nécessaire pour satisfaire une exigence réglementaire particulière, l'utilisation d'une dose maximale prédéterminée supplémentaire de 5 000 mg/kg peut être envisagée (voir annexe 2). Par souci de protection des animaux, l'essai de substances en catégorie 5 du SGH (2 000 - 5 000 mg/kg) est déconseillé et ne doit être envisagé que lorsqu'il est très probable qu'il donnera des résultats qui présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé des hommes et des animaux ou de l'environnement.

1.5.3. **Essai limite**

L'essai limite est utilisé principalement lorsque l'expérimentateur dispose d'informations indiquant que la substance d'essai n'est probablement pas toxique, c'est-à-dire que sa toxicité ne se manifeste qu'au-delà des doses limites réglementaires. Des informations concernant la toxicité de la substance d'essai peuvent être déduites des connaissances acquises sur des substances, produits ou mélanges similaires déjà testés, compte tenu de l'identité et du pourcentage des composants importants sur le plan toxicologique. Quand on ne dispose pas d'informations concernant la toxicité de la substance, ou lorsqu'on s'attend à une substance toxique, il faut effectuer l'essai principal.

Un essai limite à la dose de 2 000 mg/kg peut être effectué sur six animaux (trois animaux par étape). Exceptionnellement, un essai limite à la dose de 5 000 mg/kg peut être réalisé sur trois animaux (voir annexe 2). Si une mortalité liée à la substance est observée, il peut s'avérer nécessaire de poursuivre l'essai à la dose immédiatement inférieure.

1.6. OBSERVATIONS

Les animaux doivent être observés individuellement au moins une fois pendant les 30 premières minutes suivant l'administration de la substance et régulièrement pendant les premières 24 heures, avec une attention particulière au cours des 4 premières heures; l'observation doit ensuite être quotidienne, pendant 14 jours en tout, sauf dans le cas des animaux qui meurent en cours d'étude ou qui doivent être retirés de l'étude et euthanasiés pour leur épargner des souffrances excessives. Toutefois, la durée d'observation ne doit pas être fixée de manière rigide. Elle doit être fonction des réactions de toxicité, du moment où elles apparaissent et de la durée de la période de récupération. Elle peut donc être prolongée, si nécessaire. Les moments où apparaissent et disparaissent les signes de toxicité sont importants, particulièrement quand on constate un certain retard dans l'apparition de ces signes (12). Toutes les observations sont enregistrées de façon systématique, une fiche individuelle étant établie pour chaque animal.

▼B

D'autres observations peuvent s'avérer nécessaires lorsque les animaux continuent à manifester des signes de toxicité. Les observations doivent porter sur les modifications de la peau, des poils, des yeux et des muqueuses, ainsi que de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux central et autonome, de l'activité somato-motrice et du comportement. L'attention portera en particulier sur l'observation des diverses manifestations de tremblement, convulsion, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil et coma. Les principes et critères résumés dans le document d'orientation sur les effets sur l'homme doivent être pris en considération (9). Les animaux moribonds et les animaux souffrant manifestement ou présentant des signes graves de détresse doivent être euthanasiés. Qu'il s'agisse d'animaux euthanasiés pour raisons éthiques ou d'animaux retrouvés morts, le moment de la mort doit être enregistré de façon aussi précise que possible.

1.6.1. **Poids corporel**

Le poids de chaque animal doit être déterminé peu de temps avant l'administration de la substance d'essai, et au moins une fois par semaine ensuite. Les variations de poids doivent être calculées et enregistrées. À la fin de l'essai, les animaux survivants sont pesés puis euthanasiés.

1.6.2. **Pathologie**

Tous les animaux (y compris ceux qui sont morts au cours de l'essai ou ceux qui ont été retirés de l'étude pour des raisons éthiques) doivent être soumis à une autopsie à l'échelle macroscopique. Pour chaque animal, toutes les altérations pathologiques macroscopiques doivent être enregistrées. Chez les animaux qui survivent 24 heures ou plus à l'administration de la dose initiale, l'examen microscopique des organes présentant des signes évidents de pathologie doit également être envisagé, car il peut fournir des renseignements utiles.

2. **RÉSULTATS**

Les résultats obtenus pour chaque animal doivent être présentés. Toutes les données doivent être résumées dans un tableau indiquant, pour chaque groupe d'essai, le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts pendant l'essai ou sacrifiés pour des raisons éthiques, et, pour chaque animal, le moment de la mort, la description des effets toxiques et leur évolution dans le temps ainsi que leur réversibilité éventuelle et les résultats de l'autopsie.

3. **RAPPORT**

3.1. **Rapport d'essai**

Le rapport d'essai doit contenir, s'il y a lieu, les renseignements suivants:

Substance d'essai:

— état physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (compris isomérisation),

— données relatives à l'identification, y compris numéro CAS.

Véhicule (le cas échéant):

— justification du choix du véhicule, s'il ne s'agit pas d'eau.

Animaux d'essai:

— espèce/souche utilisée,

▼B

— état microbiologique des animaux, s'il est connu,

— nombre, âge et sexe des animaux (le cas échéant, justification du choix de mâles à la place de femelles),

— origine, conditions d'hébergement, régime alimentaire, etc.

Conditions de l'essai:

— détails sur la formulation de la substance d'essai, notamment état physique du produit administré,

— détails sur le mode d'administration, notamment volume des doses et moment de l'administration,

— détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (y compris le type de régime et sa provenance ainsi que celle de l'eau),

— justification du choix de la dose initiale.

Résultats:

— tableau des réactions aux différentes doses pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris mortalité; nature, gravité et durée des effets),

— tableau des poids corporels et des variations de poids,

— poids individuels des animaux le jour du traitement, et ensuite à intervalles d'une semaine, ainsi qu'au moment de la mort ou du sacrifice,

— date et heure de la mort si celle-ci intervient avant le moment prévu du sacrifice,

— pour chaque animal, moment d'apparition et évolution des signes de toxicité et réversibilité éventuelle,

— pour chaque animal, résultats de l'autopsie et observations histopathologiques le cas échéant.

Discussion et interprétation des résultats.

Conclusions.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) Roll, R., Höfer-Bosse, Th. And Kayser, D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, p. 86

(2) Roll, R., Riebschläger, M., Mischke, U. and Kayser, D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, p. 336-341.

(3) Diener, W., Sichha, L., Mischke, U., Kayser, D. and Schlede, E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, p. 559-610

(4) Diener, W., Mischke, U., Kayser, D. and Schlede, E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, p. 729-734.

(5) Diener, W., and Schlede, E. (1999). Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, p. 129-134

(6) Schlede, E., Mischke, U., Roll, R. and Kayser, D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method — An Alternative to the LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66, p. 455-470.

▼B

(7) Schlede, E., Mischke, U., Diener, W. and Kayser, D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, p. 659-670.

(8) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. Paris.

(9) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19.

(10) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(11) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, p. 223-231.

(12) Chan, P.K. and Hayes, A.W. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd, New York, USA.

▼B

ANNEXE 1

MARCHE À SUIVRE POUR CHACUNE DES DOSES INITIALES

REMARQUES GÉNÉRALES

Les divers schémas d'essai présentés dans la présente annexe indiquent la marche à suivre pour chaque dose initiale.

— Annexe 1 A: dose initiale de 5 mg/kg de poids corporel

— Annexe 1 B: dose initiale de 50 mg/kg de poids corporel

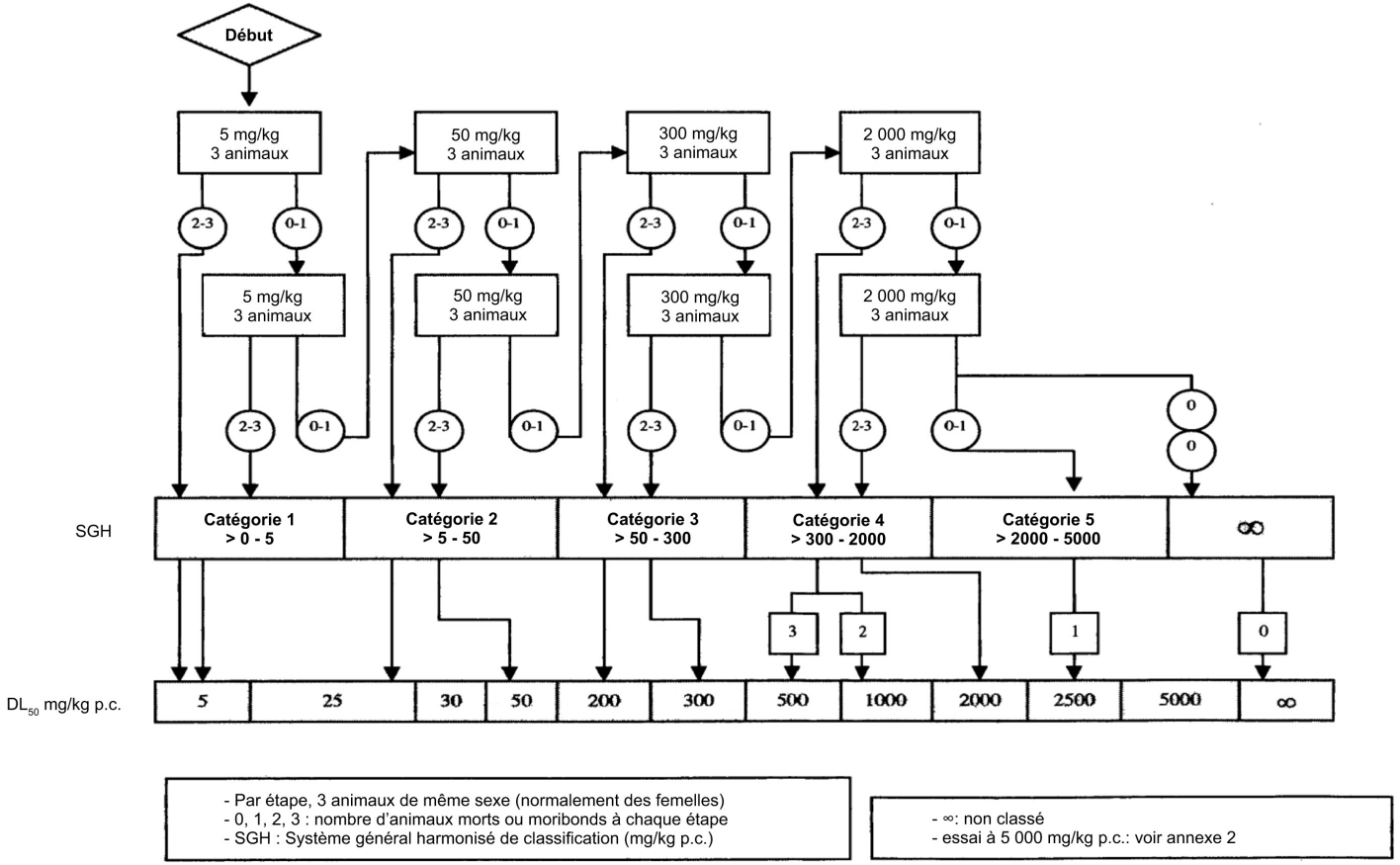
— Annexe 1 C: dose initiale de 300 mg/kg de poids corporel

— Annexe 1 D: dose initiale de 2 000 mg/kg de poids corporel

En fonction du nombre d'animaux trouvés morts ou euthanasiés, la marche à suivre est indiquée par les flèches.

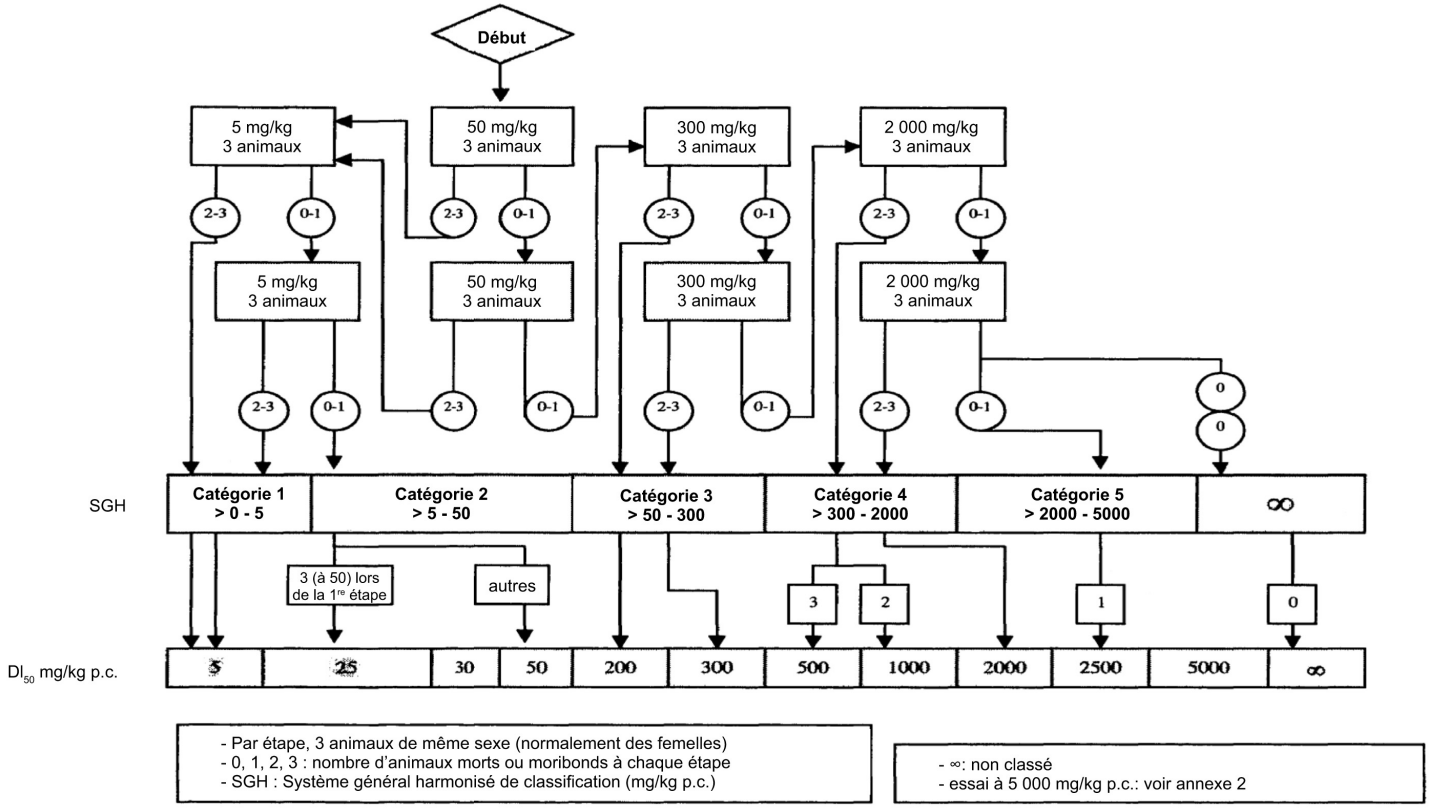
ANNEXE 1 A

MODE OPÉRATOIRE POUR UNE DOSE INITIALE DE 5 MG/KG DE POIDS CORPOREL



ANNEXE 1 B

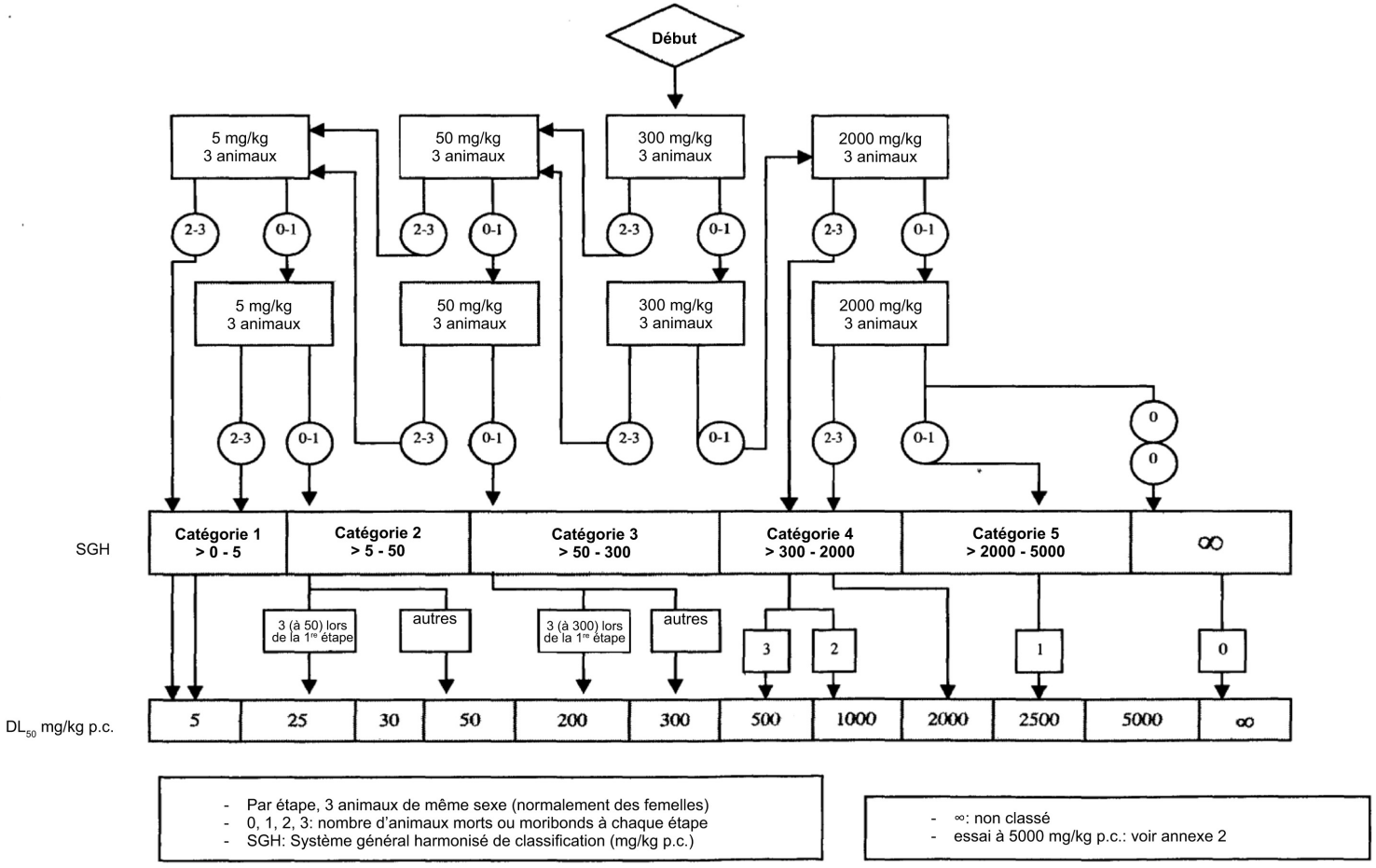
MODE OPÉRATOIRE POUR UNE DOSE INITIALE DE 50 MG/KG DE POIDS CORPOREL



02008R0440 — FR — 16.10.2019 — 008.001 — 227

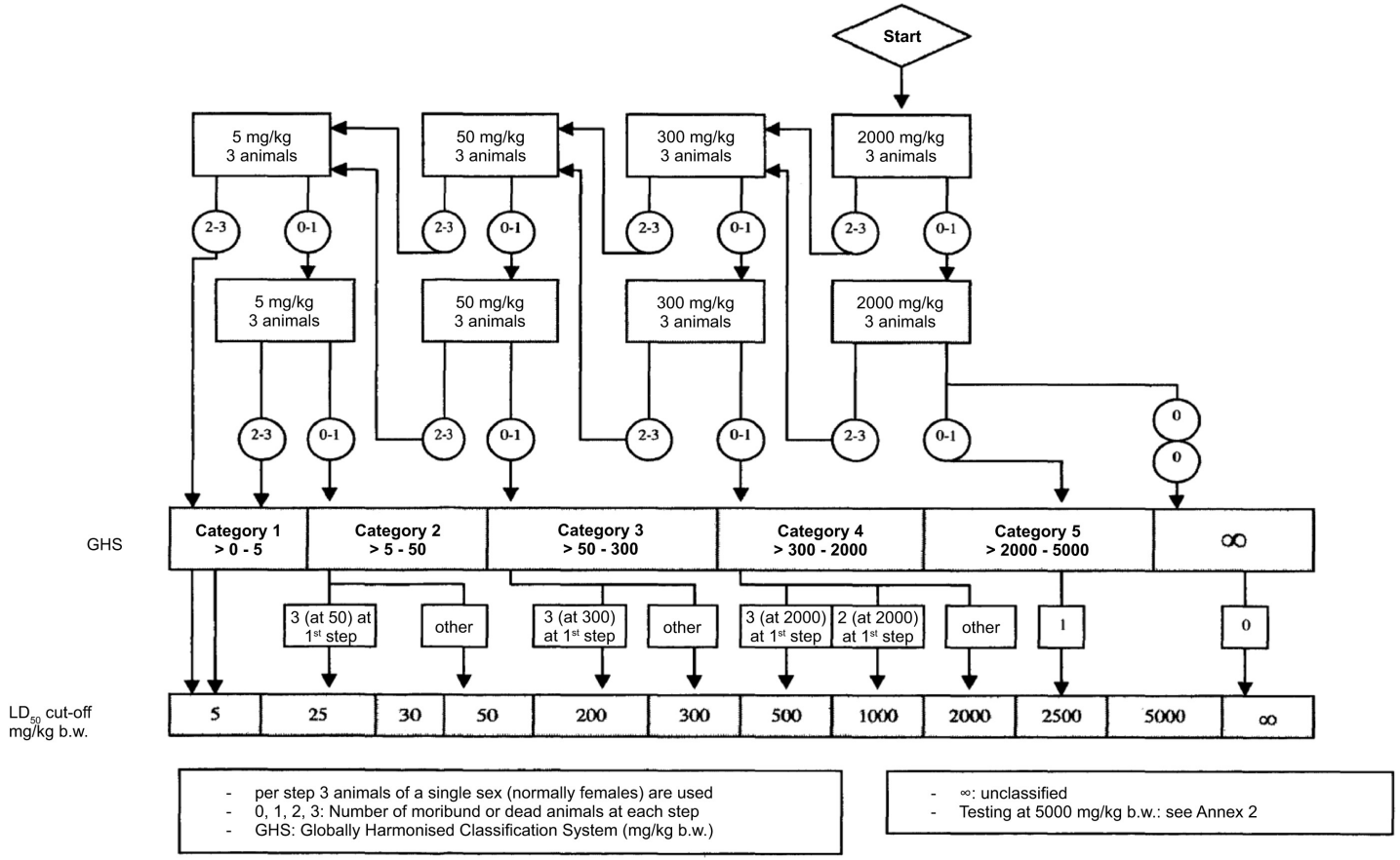
ANNEXE 1 C

MODE OPÉRATOIRE POUR UNE DOSE INITIALE DE 300 MG/KG DE POIDS CORPOREL



ANNEXE 1 D

MODE OPÉRATOIRE POUR UNE DOSE INITIALE DE 2 000 MG/KG DE POIDS CORPOREL



▼B

ANNEXE 2

CRITÈRES POUR LA CLASSIFICATION DE SUBSTANCES D'ESSAI DONT ON PRÉSUME QUE LA DL_{50} EST SUPÉRIEURE À 2 000 MG/KG, SANS RECOURIR À L'ESSAI

Les critères pour la catégorie de danger 5 sont destinés à permettre l'identification de substances qui ont une toxicité aiguë relativement faible mais qui, dans certaines conditions, peuvent se révéler dangereuses pour des populations vulnérables. Ces substances sont présumées avoir une DL_{50} orale ou cutanée comprise dans la plage 2 000 - 5 000 mg/kg ou correspondant à des doses équivalentes par d'autres voies. Les substances d'essai devraient être classées dans la catégorie SGH de danger 5, définie par 2 000 mg/kg < DL_{50} < 5 000 mg/kg, dans les cas suivants:

a) lorsque, en fonction de la mortalité, l'un des schémas des annexes 1A à 1 D oriente la substance vers cette catégorie;

b) lorsque l'on est déjà en possession de données fiables indiquant que la DL_{50} se situera dans la plage des valeurs de la catégorie 5; ou lorsque d'autres études sur des animaux ou l'observation d'effets toxiques chez l'homme suscitent de sérieuses inquiétudes pour la santé humaine;

c) par extrapolation, évaluation ou mesure de données, lorsque la classification dans une catégorie de plus grand danger n'est pas justifiée, et

   — il existe des informations fiables faisant état d'effets toxiques significatifs chez l'homme, ou

   — une certaine mortalité est observée en testant par voie orale jusqu'aux valeurs de la catégorie 4, ou

   — lorsqu'un jugement d'expert confirme l'existence de signes cliniques significatifs de toxicité lors d'un essai mené jusqu'aux valeurs de la catégorie 4, hormis diarrhée, hérissement des poils ou aspect mal soigné, ou

   — quand un jugement d'expert confirme l'existence d'informations fiables indiquant la possibilité d'effets aigus significatifs d'après les résultats des autres études sur animaux.

ESSAIS À DOSES SUPÉRIEURES À 2 000 MG/KG

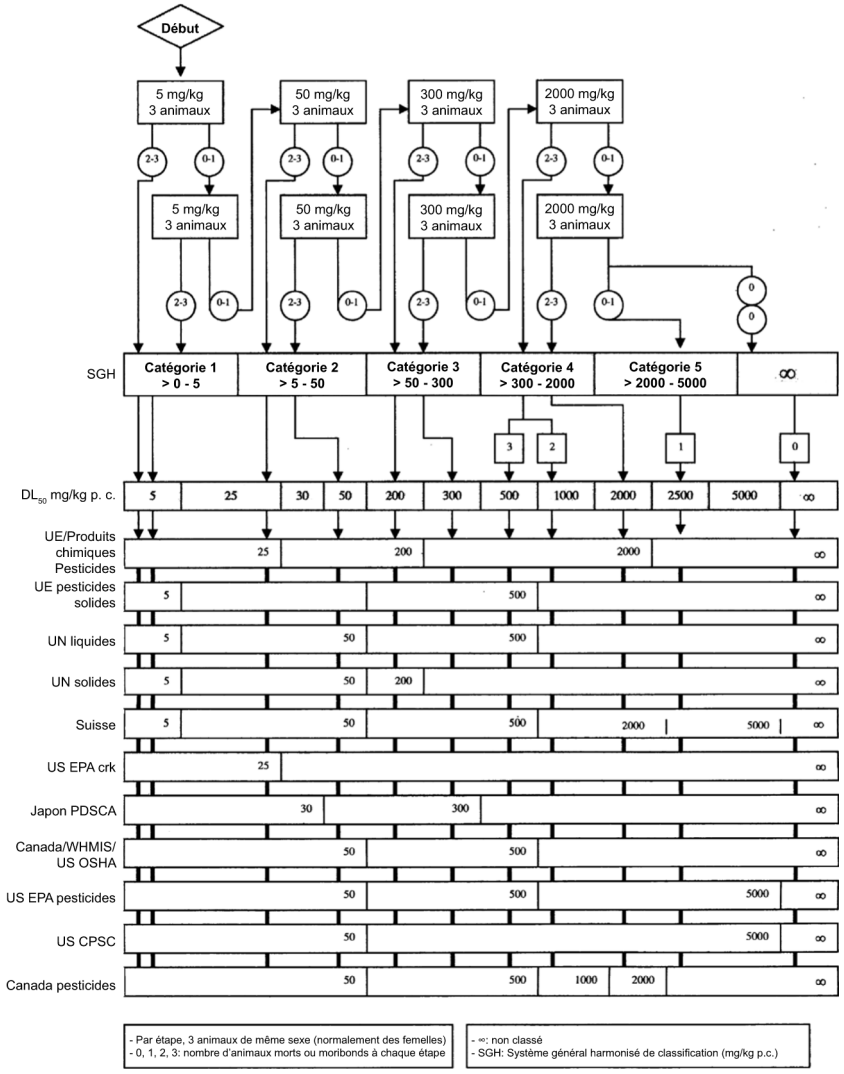
Par souci de protection des animaux, l'essai de substances à la dose de 5 000 mg/kg est déconseillé et ne devrait être envisagé que lorsqu'il est fort probable que les résultats d'un tel essai présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé des hommes et des animaux (10). Aucun essai ne doit être effectué à des doses plus élevées.

Lorsqu'un essai à 5 000 mg/kg est nécessaire, une seule étape suffit (c'est-à-dire trois animaux). Si le premier animal traité meurt, l'essai se poursuit à la dose de 2 000 mg/kg comme indiqué dans les schémas de l'annexe 1. Si le premier animal traité survit, deux autres animaux sont traités. Si un seul des trois animaux meurt, la DL_{50} est présumée supérieure à 5 000 mg/kg. Si les deux animaux meurent, l'essai se poursuit à la dose de 2 000 mg/kg.

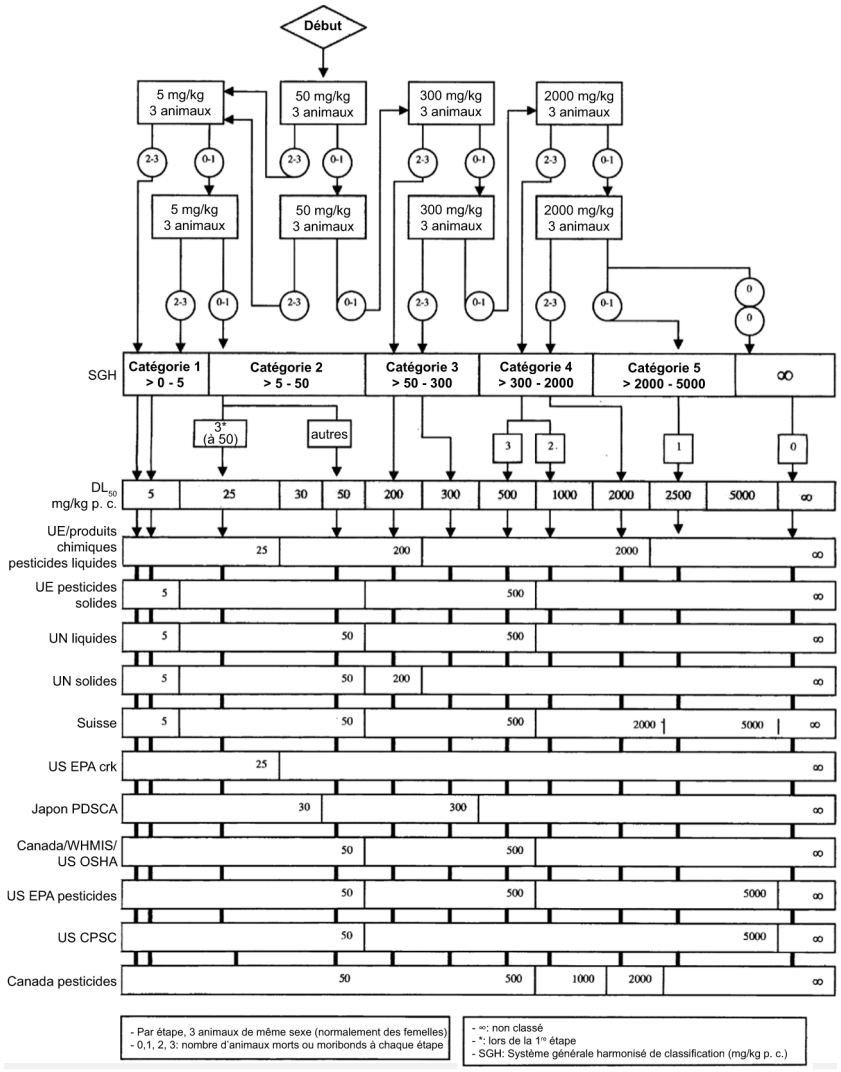
▼B

ANNEXE 3

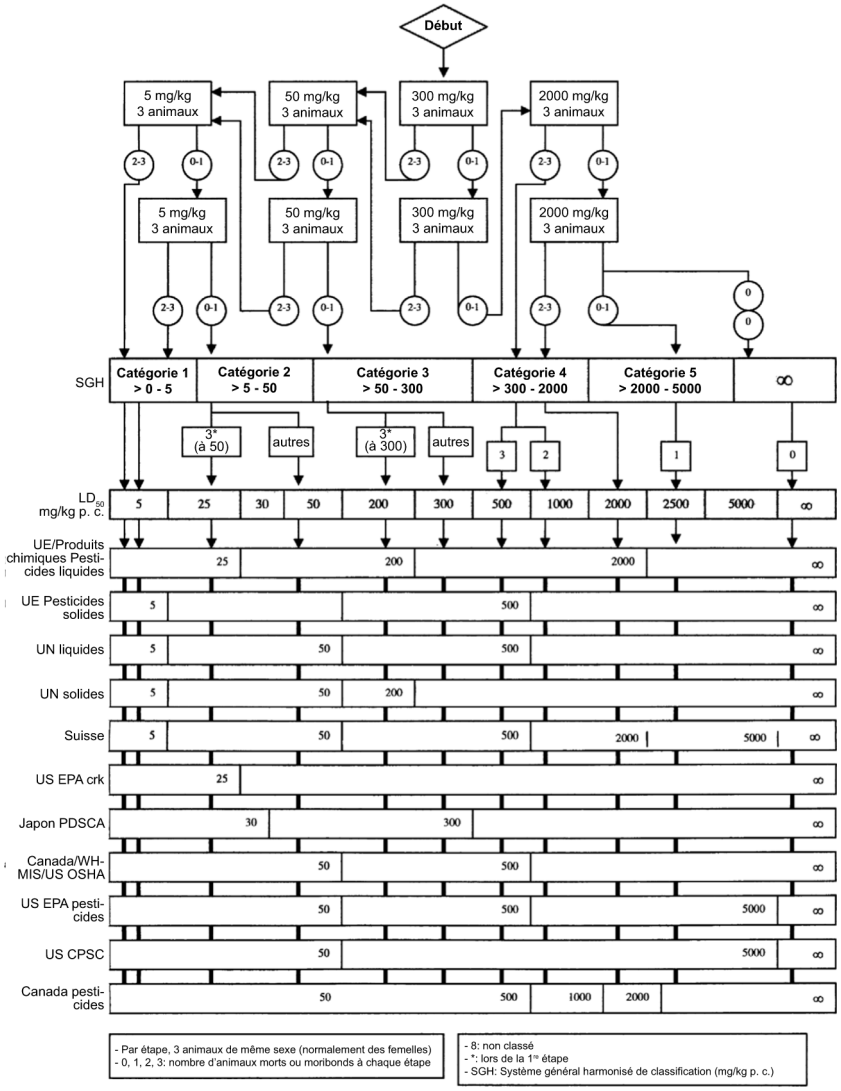
MÉTHODE D'ESSAI B.1 tris Conseils pour une classification selon le système de l'UE en attendant la mise en place effective du système général harmonisé de classification (SGH) [voir référence (8)]



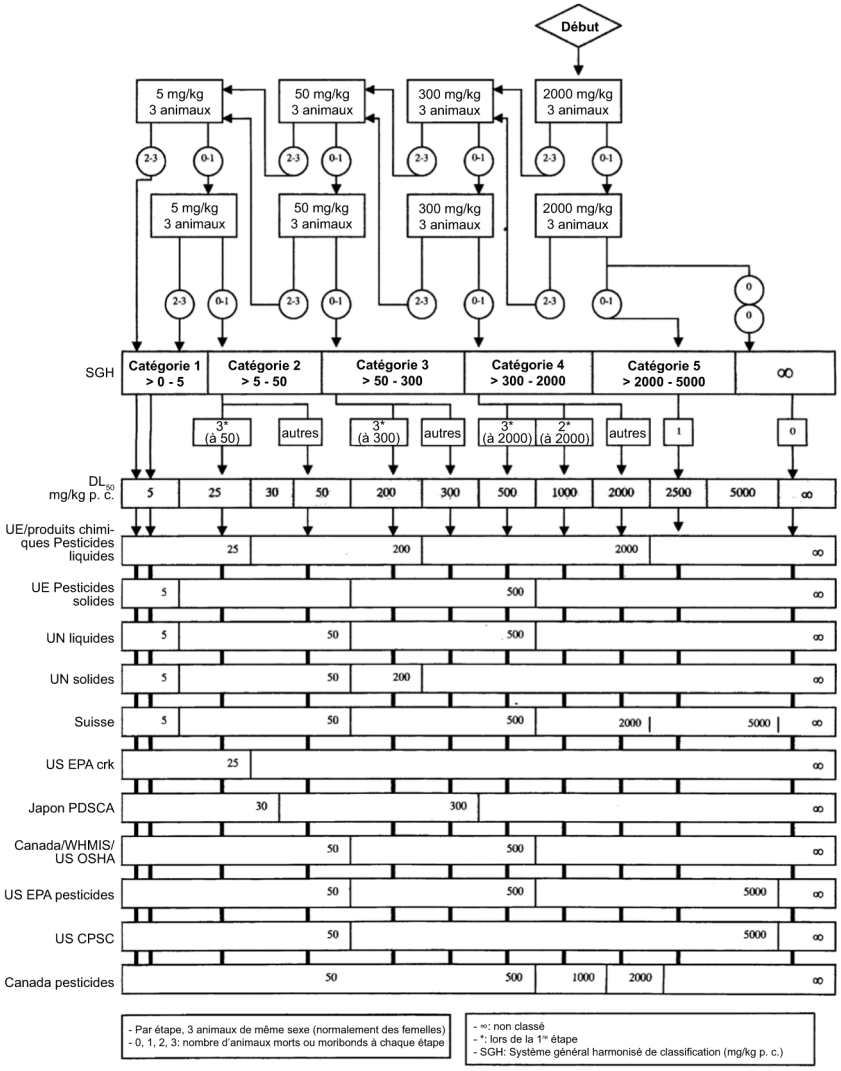
▼B


Début
5 mg/kg 3 animaux
50 mg/kg 3 animaux
300 mg/kg 3 animaux
2000 mg/kg 3 animaux
2-3
0-1
0
SGH
Catégorie 1 > 0 - 5
Catégorie 2 > 5 - 50
Catégorie 3 > 50 - 300
Catégorie 4 > 300 - 2000
Catégorie 5 > 2000 - 5000
∞
3* (à 50)
autres
DL50 mg/kg p. c.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
UE/produits chimiques pesticides liquides
UE pesticides solides
UN liquides
UN solides
Suisse
US EPA crk
Japon PDSCA
Canada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticides
US CPSC
Canada pesticides
- Par étape, 3 animaux de même sexe (normalement des femelles)
- 0,1, 2, 3: nombre d'animaux morts ou moribonds à chaque étape
- ∞: non classé
- *: lors de la 1re étape
- SGH: Système générale harmonisé de classification (mg/kg p. c.)

▼B


Début
5 mg/kg 3 animaux
50 mg/kg 3 animaux
300 mg/kg 3 animaux
2000 mg/kg 3 animaux
2-3
0-1
0
SGH
Catégorie 1 > 0 - 5
Catégorie 2 > 5 - 50
Catégorie 3 > 50 - 300
Catégorie 4 > 300 - 2000
Catégorie 5 > 2000 - 5000
∞
3* (à 50)
autres
3* (à 300)
autres
3
2
1
0
LD50 mg/kg p. c.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
UE/Produits chimiques Pesticides liquides
25 200 2000 ∞
UE Pesticides solides
5 500 ∞
UN liquides
5 50 500 ∞
UN solides
5 50 200 ∞
Suisse
5 50 500 2000 5000 ∞
US EPA crk
25 ∞
Japon PDSCA
30 300 ∞
Canada/WHMIS/US OSHA
50 500 ∞
US EPA pesticides
50 500 5000 ∞
US CPSC
50 5000 ∞
Canada pesticides
50 500 1000 2000 ∞
- Par étape, 3 animaux de même sexe (normalement des femelles)
- 0, 1, 2, 3: nombre d'animaux morts ou moribonds à chaque étape
- 8: non classé
- *: lors de la 1re étape
- SGH: Système général harmonisé de classification (mg/kg p. c.)

▼B


Début
5 mg/kg 3 animaux
50 mg/kg 3 animaux
300 mg/kg 3 animaux
2000 mg/kg 3 animaux
2-3
0-1
0
SGH
Catégorie 1 > 0 - 5
Catégorie 2 > 5 - 50
Catégorie 3 > 50 - 300
Catégorie 4 > 300 - 2000
Catégorie 5 > 2000 - 5000
∞
3* (à 50)
autres
3* (à 300)
3* (à 2000)
2* (à 2000)
1
DL50 mg/kg p. c.
5
25
30
50
200
300
500
1000
2000
2500
5000
UE/produits chimiques Pesticides liquides
UE Pesticides solides
UN liquides
UN solides
Suisse
US EPA crk
Japon PDSCA
Canada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticides
US CPSC
Canada pesticides
- Par étape, 3 animaux de même sexe (normalement des femelles)
- 0, 1, 2, 3: nombre d'animaux morts ou moribonds à chaque étape
- ∞: non classé
- *: lors de la 1re étape
- SGH: Système général harmonisé de classification (mg/kg p. c.)

▼M4

B.2. TOXICITÉ AIGUË PAR INHALATION

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 403 (2009) de l'OCDE (1) pour les essais de produits chimiques. Une première ligne directrice 403 pour les essais de toxicité aiguë par inhalation a été adoptée en 1981. La présente méthode d'essai B.2 (équivalente à la ligne directrice 403 révisée a été conçue afin d'offrir une plus grande souplesse, de réduire l'utilisation d'animaux et de répondre aux exigences règlementaires. Elle décrit deux types d'études: un protocole traditionnel de détermination de la CL_{50} et un protocole «concentration × temps» (C × t). Les principales caractéristiques de cette ligne directrice tiennent au fait qu'elle permet d'obtenir une relation concentration-réponse pour les effets non létaux à létaux, afin d'en déduire une concentration létale médiane (CL_{50}), une concentration seuil non létale (comme la CL_{01}) et une pente, ainsi que de déterminer si un des sexes est plus sensible à la substance d'essai. Le protocole C × t est utilisé lorsque s'applique une réglementation particulière ou pour un besoin scientifique qui nécessite un essai sur des animaux pour plusieurs durées d'exposition différentes, par exemple à des fins d'aménagement du territoire ou de planification des interventions d'urgence: calcul des niveaux guides d'exposition aiguë, recommandations pour la planification des mesures d'urgence, niveaux seuil d'exposition aiguë, etc.

2. On trouvera dans le document d'orientation n° 39 sur les essais de toxicité aiguë par inhalation (document d'orientation 39) des indications sur la conduite et l'interprétation des études liées à la présente méthode d'essai (2).

3. Le document d'orientation 39 (2) regroupe les définitions utilisées dans le contexte de la présente méthode d'essai.

4. La présente méthode d'essai permet de caractériser les substances d'essai, de les soumettre à une évaluation quantitative des risques, et de classer conformément au règlement (CE) n° 1272/2008 (3). Le document d'orientation 39 (2) fournit des indications sur le choix de la méthode d'essai appropriée pour les essais de toxicité aiguë. Lorsque seules sont requises des informations sur la classification et l'étiquetage, le chapitre B.52 de la présente annexe (4) est généralement recommandé [voir document d'orientation 39 (2)]. La méthode d'essai B.2 n'est pas spécifiquement destinée à tester des matériaux spéciaux comme les substances isométriques ou fibreuses faiblement solubles ou les nanomatériaux manufacturés.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

5. Avant d'entreprendre un essai conformément à la présente méthode d'essai, le laboratoire d'essai devra prendre en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai, y compris les études existantes [par exemple, le chapitre B.52 de la présente annexe (4)] dont les résultats éviteraient des essais supplémentaires, afin de recourir le moins possible aux animaux. Parmi les informations utiles pour la détermination de l'espèce, de la souche, du sexe, du mode d'exposition et des concentrations d'essai appropriés, citons: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai, les résultats de tous les essais de toxicité in vitro ou in vivo auxquels elle a été soumise, son (ses) utilisation(s) escomptée(s) et les risques d'exposition humaine, les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques sur les substances structurellement apparentées, voir document d'orientation 39 (2).

▼M4

6. Il convient d'éviter autant que possible de tester des substances corrosives et/ou irritantes à des concentrations susceptibles d'engendrer une souffrance sévère et/ou une détresse. Pour déterminer s'il est possible de renoncer à des essais complémentaires, le potentiel de corrosion/d'irritation fait l'objet d'une évaluation reposant sur un jugement d'expert basé sur les éléments suivants: données expérimentales sur l'homme et l'animal (provenant, par exemple, d'essais à doses répétées réalisés à des concentrations non corrosives ou irritantes), données in vitro existantes [par exemple chapitres B.40 (5), B.40 *bis* (6) de la présente annexe, ou ligne directrice 435 de l'OCDE (7)], valeurs du pH, informations concernant des substances analogues ou toute autre donnée pertinente. À des fins règlementaires spécifiques (par exemple pour l'établissement de plans d'urgence), la présente méthode d'essai peut être utilisée pour exposer des animaux à ces substances car elle donne au directeur de l'étude ou à l'investigateur principal la maîtrise du choix des concentrations cibles. Celles-ci ne doivent cependant pas induire d'effets corrosifs/irritants importants, mais elles sont suffisantes pour prolonger la courbe de concentration-réponse jusqu'à des niveaux correspondant à l'objectif scientifique et règlementaire de l'essai. Ces concentrations sont choisies au cas par cas et une justification du choix des concentrations est apportée, voir document d'orientation 39 (2).

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. La présente méthode d'essai B.2 révisée doit en principe permettre d'obtenir des informations suffisantes sur la toxicité aiguë d'une substance d'essai pour procéder à son classement, et fournir les données sur sa létalité nécessaires aux évaluations quantitatives des risques (CL_{50}, CL_{01} et pente, par exemple) pour l'un des sexes ou les deux. Cette méthode d'essai propose deux méthodes. La première suit un protocole traditionnel dans lequel des groupes d'animaux sont exposés à une concentration limite (essai limite) ou à une série de concentrations suivant un processus séquentiel pendant une durée prédéterminée de quatre heures en général. Des objectifs règlementaires spécifiques peuvent nécessiter de recourir à d'autres durées d'exposition. La seconde méthode suit un protocole «concentration x temps» ($C \times t$) dans lequel des groupes d'animaux sont exposés à une concentration (concentration limite) ou à une série de concentrations différentes sur des durées différentes.

8. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés. Ils sont pris en compte dans l'interprétation des résultats de l'essai au même titre que ceux qui succombent au cours de l'essai. Le document d'orientation n° 19 de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables détaille les critères orientant la décision d'euthanasier les animaux moribonds ou en grande souffrance, et aide à reconnaître une mort prévisible ou imminente (8).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Choix des espèces animales

9. Le choix s'orientera vers de jeunes rongeurs en bonne santé, de souches communément utilisées en laboratoire. Le rat étant l'espèce la plus utilisée, il faudra justifier l'emploi d'autres espèces.

Préparation des animaux

10. Les femelles sont nullipares et non gravides. Le jour de leur exposition, les animaux sélectionnés sont de jeunes adultes âgés de 8 à 12 semaines. Leur poids corporel n'excède pas, pour chaque sexe, ± 20 % du poids moyen des animaux du même âge précédemment exposés. Sélectionnés au hasard, les animaux sont marqués pour être identifiés individuellement. En vue de leur acclimatation aux conditions de laboratoire, ils sont conservés dans leur cage pour une période d'au minimum 5 jours avant le début de l'essai. Les animaux sont également acclimatés aux appareils d'essai, pendant une courte période précédant l'essai, afin d'atténuer le stress causé par leur introduction dans un nouvel environnement.

▼M4

Conditions d'élevage des animaux

11. La température du local expérimental où les animaux sont conservés est de 22 ± 3 °C. Le taux d'humidité relative est idéalement maintenu entre 30 et 70 %, encore qu'il ne soit pas toujours possible de le faire si l'eau est utilisée comme véhicule. Avant et après exposition, les animaux sont généralement mis en cage en groupes par sexe et par concentration, mais le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal, et ne doit engendrer qu'un minimum de pertes dues au cannibalisme et aux combats. Si les animaux sont exposés «nez seul», il peut être nécessaire de les acclimater aux tubes de contention. Ceux-ci ne doivent pas provoquer chez les animaux de stress excessif, qu'il soit de nature physique, thermique ou dû à leur immobilisation. Les contraintes qu'ils subissent peuvent en effet modifier les paramètres physiologiques mesurés de l'animal, comme sa température corporelle (hyperthermie) et/ou son volume respiratoire par minute. Si l'on dispose de données génériques montrant que de telles modifications ne se produisent pas de façon appréciable, alors la période d'adaptation préalable aux tubes de contention n'est pas nécessaire. Les animaux exposés «corps entier» à un aérosol sont enfermés individuellement pendant l'exposition pour empêcher la filtration de l'aérosol d'essai par la fourrure des congénères. À l'exception des périodes d'exposition, le régime alimentaire des animaux est le régime classique et certifié de laboratoire, avec eau potable à satiété. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité.

Chambre d'inhalation

12. Le choix de la chambre d'inhalation prend en compte la nature de la substance d'essai et l'objet de l'essai. Le mode d'exposition «nez seul» (qui inclut les dispositifs «tête seule», «nez seul» et «museau seul») est privilégié. Le mode d'exposition «nez seul» est généralement choisi pour les études d'aérosols liquides ou solides et pour les vapeurs susceptibles de se condenser en aérosols. L'utilisation d'un mode d'exposition «corps entier» peut être préférable pour les besoins spécifiques de l'étude, mais cela est alors justifié dans le rapport d'étude. Pour assurer la stabilité de l'atmosphère d'une chambre d'exposition «corps entier», on veille à ce que le volume total des animaux d'expérience ne dépasse pas 5 % du volume de la chambre. Le document d'orientation 39 (2) décrit les principes des techniques d'exposition «corps entier» ou «nez seul», ainsi que leurs avantages et inconvénients spécifiques.

CONDITIONS D'EXPOSITION

Administration des concentrations

13. Les expositions «nez seul» peuvent durer jusqu'à 6 heures pour les rats. Pour les souris, les expositions «nez seul» ne dépassent pas 4 heures en général. Si des essais d'une durée plus longue sont nécessaires, une justification est apportée, voir document d'orientation 39 (2). Les animaux exposés «corps entier» à des aérosols demeurent seuls dans la chambre afin d'éviter l'ingestion de la substance d'essai par le toilettage de leurs compagnons. Les animaux sont privés de nourriture pendant la période d'exposition. Dans une exposition «corps entier», les animaux peuvent boire de l'eau.

14. Les animaux sont exposés à la substance d'essai présentée sous forme de gaz, de vapeur, d'aérosol ou sous une forme mixte. L'état physique à tester dépend des propriétés physico-chimiques de la substance, de la concentration choisie, et/ou de la forme physique sous laquelle il est le plus probable qu'elle se présente lors de sa manipulation et de son utilisation. Les substances d'essai chimiquement réactives ou hygroscopiques sont testées sous air sec. On prendra soin d'éviter les concentrations susceptibles de provoquer une explosion.

▼M4

Répartition granulométrique

15. Une mesure de la taille des particules est réalisée pour tous les aérosols et les vapeurs susceptibles de se condenser pour former des aérosols. Pour que toutes les régions pertinentes de l'appareil respiratoire soient exposées, il est recommandé d'utiliser des aérosols dont le diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) se situe entre 1 et 4 μm, avec un écart type géométrique (σg) compris entre 1,5 et 3,0 (2) (9) (10). Un effort raisonnable est fourni pour remplir ces conditions, mais si tel n'est pas le cas, un jugement d'expert est nécessaire. Par exemple, les particules des fumées métalliques peuvent avoir une taille inférieure à cette norme, tandis que les particules chargées, les fibres et les substances hygroscopiques (dont la taille augmente dans l'environnement humide de l'appareil respiratoire) peuvent avoir une taille supérieure.

Préparation de la substance d'essai dans un véhicule

16. Pour atteindre la concentration et la taille granulométrique appropriées de la substance d'essai, il est possible d'avoir recours à un véhicule; en règle générale, l'eau est choisie de préférence. Les substances particulaires peuvent être soumises à des procédés mécaniques afin d'atteindre la répartition granulométrique requise, mais un soin particulier devra être pris de ne pas décomposer ou altérer la substance d'essai. Lorsque les procédés mécaniques sont suspectés d'avoir altéré la composition de la substance d'essai (température extrême due aux frictions d'un broyage excessif, par exemple), la composition de la substance d'essai devra être vérifiée analytiquement. On prendra soin de ne pas contaminer la substance d'essai. Il n'est pas nécessaire de tester les substances granulaires non friables qui sont élaborées précisément pour ne pas être inhalables. Un test d'usure de surface est réalisé pour démontrer que la manipulation de la substance granulaire ne produit pas de particules respirables. Dans le cas contraire, un essai de toxicité par inhalation est réalisé.

Animaux témoins

17. Un groupe témoin négatif (air) n'est pas nécessaire. Lorsqu'un véhicule autre que l'eau est utilisé pour produire l'atmosphère d'essai, un groupe témoin du véhicule est utilisé seulement quand on ne dispose pas de données historiques sur la toxicité. Si aucune toxicité n'a été détectée lors de l'étude d'une substance d'essai préparée dans un véhicule, ce dernier est considéré comme non toxique à la concentration testée; il n'y a donc pas lieu d'utiliser de témoin du véhicule.

CONTRÔLE DES CONDITIONS D'EXPOSITION

Débit d'air dans la chambre d'exposition

18. Le débit d'air dans la chambre est contrôlé avec soin, surveillé en continu et enregistré au moins toutes les heures pendant chaque exposition. Le suivi de la concentration de l'atmosphère d'essai (ou stabilité temporelle) constitue une mesure complète de tous les paramètres dynamiques et fournit un moyen indirect de contrôler tous les paramètres dynamiques pertinents de production de l'atmosphère d'essai. On prendra particulièrement soin d'éviter toute re-respiration dans les chambres d'exposition «nez seul» lorsque le débit d'air à travers le système d'exposition ne permet pas de produire une circulation dynamique de l'atmosphère contenant la substance d'essai. Des méthodologies sont prévues pour démontrer l'absence de re-respiration dans les conditions expérimentales choisies (2) (11). La concentration d'oxygène est d'au moins 19 % et celle de dioxyde de carbone ne dépasse pas 1 %. Si ces conditions ne peuvent être respectées, les concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone sont mesurées.

▼M4

Température et humidité relative de la chambre d'exposition

19. La température de la chambre d'exposition est maintenue à 22 ± 3 °C. Dans les cas d'exposition «nez seul» et «corps entier» l'humidité relative dans la zone où respire l'animal est surveillée et enregistrée trois fois au minimum pour les durées allant jusqu'à 4 heures, et toutes les heures pour des durées plus courtes. L'humidité relative est de préférence comprise entre 30 et 70 %. Il est possible que ce taux ne puisse être atteint (par exemple lorsque la substance d'essai se présente sous forme de solution aqueuse), ou qu'il ne puisse être mesuré en raison d'interférences de la substance d'essai avec la méthode d'essai.

Substance d'essai: concentration nominale

20. Dans la mesure du possible, la concentration nominale dans la chambre d'exposition est calculée et enregistrée. La concentration nominale est la masse de la substance d'essai divisée par le volume d'air total qui passe dans le circuit de la chambre d'inhalation. La concentration nominale ne sert pas à caractériser l'exposition des animaux, mais une comparaison de la concentration nominale avec la concentration réelle donne une indication de la capacité de production du système d'essai, et peut donc permettre de mettre en évidence des problèmes de production.

Substance d'essai: concentration réelle

21. La concentration réelle est la concentration de la substance d'essai dans la zone de la chambre d'inhalation où les animaux respirent. Les concentrations réelles peuvent être obtenues par des méthodes spécifiques (par exemple, échantillonnage direct, méthodes d'adsorption ou de réaction chimique, et caractérisation analytique ultérieure) ou par des méthodes non spécifiques comme la gravimétrie sur filtre. Le recours à l'analyse gravimétrique n'est acceptable que pour des aérosols ne contenant qu'un seul composant en poudre ou pour des aérosols de liquides peu volatils, et des caractérisations spécifiques à la substance d'essai sont également effectuées par une préétude appropriée. Il est aussi possible d'avoir recours à la gravimétrie pour déterminer la concentration d'un aérosol contenant plusieurs composants en poudre, mais des données analytiques sont alors nécessaires, afin de démontrer que la composition du produit en suspension dans l'air est analogue à celle du produit de départ. Faute de cette information, il peut s'avérer nécessaire de soumettre la substance d'essai (idéalement en suspension dans l'air) à une nouvelle analyse à intervalles réguliers tout au long de l'étude. Pour des agents aérosolisés susceptibles de s'évaporer ou de se sublimer, il faut démontrer que toutes les phases ont été recueillies selon la méthode choisie. Les concentrations cibles, nominales et réelles sont fournies dans le rapport d'étude, mais seules les concentrations réelles sont utilisées dans les analyses statistiques pour calculer la valeur des concentrations létales.

22. Un seul lot de la substance d'essai est utilisé, si possible, et l'échantillon est conservé dans des conditions préservant sa pureté, son homogénéité et sa stabilité. Avant le début de l'étude, il convient de réaliser une caractérisation de la substance d'essai afin de déterminer sa pureté et, si cela est techniquement possible, son identité et les quantités de contaminants et d'impuretés identifiés. Pour cela, on pourra recueillir les données suivantes: temps de rétention et surface relative du pic, poids moléculaire obtenu par spectroscopie de masse ou chromatographie en phase gazeuse, ou autres estimations. Bien que le laboratoire d'essai ne soit pas responsable de l'identification de la substance d'essai, il peut, par prudence, confirmer au moins une partie des caractéristiques fournies par le donneur d'ordre (couleur, nature physique, etc.).

23. L'atmosphère d'exposition est maintenue aussi constante que possible et suivie soit en continu, soit de façon intermittente suivant la méthode d'analyse. Lorsque l'injection s'effectue de façon intermittente, les échantillons d'atmosphère de la chambre sont prélevés au moins deux fois sur une étude de quatre heures. En cas d'impossibilité en raison de débits d'air limités ou de faibles concentrations, le recueil d'un échantillon pour toute la période d'exposition est acceptable. Si des fluctuations nettes apparaissent d'un échantillon à un autre, on a recours à quatre échantillons par exposition pour les concentrations d'essai suivantes. Les écarts entre la concentration

▼M4

dans chaque chambre et la concentration moyenne n'excèdent pas ± 10 % pour les gaz et vapeurs ou ± 20 % pour les aérosols liquides ou solides. Il convient de calculer et de noter le temps d'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}). La durée d'une exposition couvre le temps de production de la substance d'essai, y compris le temps nécessaire pour l'égalisation des concentrations dans la chambre d'exposition t_{95}. Des indications pour l'estimation de t_{95} sont fournies dans le document d'orientation 39 (2).

24. Pour des systèmes très complexes constitués de gaz ou vapeurs et d'aérosols (atmosphères de combustion ou substances d'essai propulsées à partir de produits/dispositifs spécialisés, par exemple), chaque phase peut se comporter différemment dans la chambre d'inhalation. Pour chacune des phases (gaz ou vapeur et aérosol), on choisit donc au moins une substance indicatrice (analyte), en général la substance active principale dans le mélange. Quand la substance d'essai est un mélange, la concentration analytique devra être indiquée pour le mélange et pas uniquement pour la substance active ou le composant (analyte). Pour plus d'informations sur les concentrations réelles, se reporter au document d'orientation 39 (2).

Substance d'essai: répartition granulométrique

25. La répartition granulométrique des aérosols est déterminée au minimum deux fois pour chaque exposition de 4 heures à l'aide d'un impacteur en cascade ou d'un autre instrument, comme un spectromètre de mesure de la taille des particules aérodynamiques. Si les résultats obtenus avec l'impacteur en cascade et l'autre instrument se révèlent équivalents, ce dernier peut être utilisé tout au long de l'étude. Pour confirmer la capacité de recueil des particules de l'outil principal, un second instrument devra être utilisé en parallèle, par exemple un filtre gravimétrique ou un barboteur à gaz/impacteur. La concentration massique obtenue par l'analyse granulométrique se rapproche, dans des limites raisonnables, de celle obtenue par l'analyse sur filtre, voir document d'orientation 39 (2). Si cette équivalence est établie au début de la phase d'étude, il n'est pas nécessaire d'effectuer des mesures de confirmation dans la suite de l'étude. Pour le bien-être des animaux, il convient de réduire au minimum les données douteuses qui nécessiteraient de répéter une exposition. Une répartition granulométrique est effectuée dans le cas des vapeurs, s'il est possible qu'une condensation de la vapeur conduise à la formation d'un aérosol, ou si des particules sont détectées dans une atmosphère de vapeur susceptible de présenter des phases mixtes (voir paragraphe 15).

MODE OPÉRATOIRE

26. Les deux types d'études décrits ci-dessous sont le protocole traditionnel et le protocole C × t. Tous deux peuvent comprendre une étude préliminaire, une étude principale et/ou un essai limite (protocole traditionnel) ou un essai à une concentration limite (C × t). Si l'un des sexes est connu pour être plus sensible à la substance d'essai, le directeur de l'étude peut choisir de réaliser ces essais avec seulement des animaux de ce sexe. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées «nez seul», il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Avant le début de l'étude, toutes les données disponibles sont examinées afin de réduire l'usage des animaux. Par exemple, les données obtenues selon le chapitre B.52 de la présente annexe (4) peuvent supprimer la nécessité d'une étude préliminaire et aussi démontrer si l'un des sexes est plus sensible à la substance d'essai, voir document d'orientation 39 (2).

▼M4

PROTOCOLE TRADITIONNEL

Considérations générales sur le protocole traditionnel

27. Dans une étude traditionnelle, des groupes d'animaux sont exposés à une substance d'essai pendant une période de temps fixée (généralement 4 heures) dans une chambre d'exposition «nez seul» ou «corps entier». Les animaux sont exposés soit à une concentration limite (essai limite), soit à trois concentrations au minimum selon une procédure séquentielle (étude principale). Une étude préliminaire peut précéder l'étude principale, sauf s'il existe déjà des informations concernant la substance d'essai, provenant par exemple d'une étude précédente effectuée selon l'étude B.52, voir document d'orientation 39 (2).

Étude préliminaire pour le protocole traditionnel

28. Une étude préliminaire permet d'estimer l'activité de la substance d'essai, d'identifier des différences entre les sexes quant à la sensibilité à cette substance, et de choisir plus facilement les niveaux de concentration pour l'étude principale ou l'essai limite. Lors du choix des niveaux de concentration pour l'étude préliminaire, toutes les informations disponibles sont prises en compte, y compris les données (Q)SAR et les données correspondant à des produits chimiques analogues. Pour chaque concentration, on exposera au maximum trois mâles et trois femelles (il peut être nécessaire d'utiliser 3 animaux par sexe pour établir une différence de sensibilité entre les sexes). Une étude préliminaire peut être effectuée avec une seule concentration, ou plusieurs si nécessaire. Elle ne porte pas sur un nombre d'animaux ou de concentrations tel qu'elle ressemblerait à une étude principale. Il est possible d'utiliser les résultats d'une étude B.52 (4) précédente au lieu de réaliser une étude préliminaire, voir document d'orientation 39 (2).

Essai limite pour le protocole traditionnel

29. L'essai limite est utilisé si l'on sait ou si l'on prévoit que la substance d'essai sera virtuellement non toxique, c'est-à-dire qu'elle ne suscitera une réponse de toxicité qu'au-delà de la concentration limite réglementaire. Dans un essai limite, un seul groupe de trois mâles et trois femelles est exposé à la substance d'essai à une concentration limite. Des informations sur la toxicité de la substance d'essai peuvent être tirées d'essais déjà pratiqués sur des substances analogues, en tenant compte de l'identité et du pourcentage des composants dont la toxicité est avérée. Si l'on manque d'informations sur la toxicité de la substance d'essai, ou si l'on s'attend à ce qu'elle soit toxique, l'essai principal est réalisé.

30. Le choix des concentrations limites dépend généralement des exigences règlementaires. Lorsqu'on applique le règlement (CE) n° 1272/2008, les concentrations limites pour les gaz, les vapeurs et les aérosols sont respectivement de 20 000 ppm, 20 mg/l et 5 mg/l (ou, à défaut, la concentration maximale pouvant être atteinte) (3). Il peut s'avérer techniquement difficile d'atteindre les concentrations limites de certaines substances d'essai, en particulier pour les vapeurs et les aérosols. Pour les essais d'aérosols, le principal objectif est d'atteindre une taille de particule qui soit respirable (c'est-à-dire d'un DAMM de 1 à 4 μm), ce qui est possible avec la plupart des substances d'essai à des concentrations de 2 mg/l. Les essais sur des aérosols à des concentrations supérieures à 2 mg/l ne sont tentés que si l'on peut obtenir des particules de taille respirable, voir document d'orientation 39 (2). Selon le règlement (CE) n° 1272/2008, il est déconseillé de réaliser des essais au-delà des concentrations limites pour des raisons de bien-être des animaux (3). Les essais aux concentrations limites ne sont envisagés que s'il est très probable que leurs résultats présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé humaine (3), et une justification est fournie dans le rapport d'étude. En cas de substance potentiellement explosive, on prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de provoquer une explosion. Afin d'éviter le recours inutile à des animaux, un essai sans animaux est effectué avant l'essai limite pour s'assurer qu'il est possible d'atteindre dans la chambre les conditions expérimentales d'un essai limite.

▼M4

31. Si une mortalité ou un état moribond sont observés à la concentration limite, les résultats de l'essai limite peuvent servir d'étude préliminaire pour les essais suivants à d'autres concentrations (voir étude principale). Si la concentration limite est impossible à atteindre du fait des propriétés physiques ou chimiques de la substance d'essai, c'est la concentration maximale pouvant être atteinte qui devra être testée. Si la létalité à cette concentration est inférieure à 50 %, il n'y a pas lieu de poursuivre l'essai. Si la concentration limite n'a pas pu être atteinte, une explication, étayée par des données, est fournie dans le rapport d'étude. Si la concentration maximale pouvant être atteinte pour une vapeur ne provoque pas de toxicité, il peut être nécessaire de produire la substance d'essai sous la forme d'un aérosol liquide.

Étude principale pour le protocole traditionnel

32. Une étude principale fait en général appel à cinq mâles et cinq femelles (ou cinq animaux du sexe le plus sensible, s'il est connu) par niveau de concentration, avec au minimum trois niveaux de concentration. Les niveaux de concentration sont suffisamment nombreux pour que l'on puisse obtenir une analyse statistique fiable. L'intervalle de temps entre l'exposition des différents groupes est déterminé par le moment d'apparition, la durée et la gravité des signes de toxicité observés. L'exposition au niveau de concentration supérieur est retardée jusqu'à ce que l'on soit raisonnablement sûr que les animaux précédemment soumis au traitement ont survécu. Le directeur de l'étude peut alors ajuster la concentration cible pour le groupe suivant. Pour les essais de toxicité par inhalation, qui nécessitent des technologies sophistiquées, il ne sera pas toujours possible de procéder ainsi, c'est pourquoi l'exposition des animaux à la concentration supérieure devra se baser sur l'expérience acquise et un jugement scientifique. Pour les essais portant sur des mélanges, il convient de se référer au document d'orientation 39 (2).

PROTOCOLE «CONCENTRATION × TEMPS» (C × T)

Considérations générales sur le protocole C × t

33. Une étude séquentielle «concentration × temps» (C × t) peut constituer une alternative au protocole traditionnel lorsqu'il s'agit d'évaluer la toxicité par inhalation (12) (13) (14). Avec cette approche, les animaux sont exposés à la substance d'essai à plusieurs niveaux de concentration et pour des durées d'exposition variables. Tous les essais sont réalisés dans des chambres d'exposition «nez seul», les chambres «corps entier» ne se prêtant pas à ce protocole. Un exemple de procédure séquentielle illustrant ce protocole est présenté à l'appendice 1. Une analyse de simulation a montré que le protocole traditionnel et le protocole C × t étaient tous les deux capables de donner des valeurs fiables de la CL_{50}, mais que le protocole C × t permettait en général d'obtenir des valeurs plus sûres pour la CL_{01} et la CL_{10} (15).

34. Une analyse de simulation a démontré qu'il convient généralement d'utiliser deux animaux par intervalle de C × t (un animal de chaque sexe ou deux animaux du sexe le plus sensible) pour tester 4 concentrations et 5 durées d'exposition lors de l'étude principale. Le directeur de l'étude peut choisir, dans certaines circonstances, d'utiliser deux rats de chaque sexe par intervalle de C × t (15), de manière à réduire le biais et la variabilité des estimations, augmenter le taux de succès de l'estimation et améliorer la couverture de l'intervalle de confiance. Cependant, en cas d'ajustement insuffisant aux données (en utilisant un animal par sexe ou deux animaux du sexe le plus sensible), une cinquième concentration d'exposition peut également suffire. Pour plus d'informations sur le nombre d'animaux et les concentrations à utiliser pour une étude C × t, se reporter au document d'orientation 39 (2).

▼M4

Étude préliminaire pour le protocole C × t

35. Une étude préliminaire permet d'estimer l'activité de la substance d'essai et facilite le choix des niveaux de concentration pour l'étude principale. Une étude préliminaire avec au maximum trois animaux par sexe et par concentration (pour plus de détails, voir l'appendice III du document d'orientation 39) (2) peut être utilisée afin de sélectionner une concentration de départ appropriée pour l'étude principale et de réduire le nombre d'animaux utilisés. Il peut en effet être nécessaire de recourir à trois animaux par sexe pour établir une différence selon le sexe. Ces animaux sont soumis à une exposition unique, d'une durée de 240 minutes en général. Pour évaluer la faisabilité de la production d'atmosphères d'essai appropriées, des essais techniques préliminaires sans animaux sont réalisés. Il n'est généralement pas nécessaire de procéder à une étude préliminaire si l'on dispose de données de mortalité provenant d'une étude effectuée suivant la méthode B.52 (4). Pour choisir la concentration cible initiale dans une étude B.2, le directeur de l'étude tient compte des profils de mortalité observés dans n'importe quelle étude B.52 (4) disponible, pour les deux sexes et pour toutes les concentrations testées, voir document d'orientation 39 (2).

Concentration initiale pour le protocole C × t

36. La concentration initiale (Session d'exposition I) (voir appendice 1) est soit une concentration limite, soit une concentration choisie par le directeur de l'étude sur la base d'une étude préliminaire. Des groupes constitués d'un animal de chaque sexe sont exposés à cette concentration pendant des périodes de durée variable (15, 30, 60, 120 ou 240 minutes, par exemple), soit un total de 10 animaux, pour ce qu'on appelle la Session d'exposition I (voir appendice 1).

37. Le choix des concentrations limites dépend généralement des exigences règlementaires. Lorsqu'on applique le règlement (CE) n° 1272/2008, les concentrations limites pour les gaz, les vapeurs et les aérosols sont respectivement de 20 000 ppm, 20 mg/l et 5 mg/l (ou, à défaut, la concentration maximale pouvant être atteinte) (3). Il peut s'avérer techniquement difficile d'atteindre les concentrations limites de certaines substances d'essai, en particulier pour les vapeurs et les aérosols. Pour les essais d'aérosols, l'objectif est d'atteindre une taille de particule qui soit respirable (c'est-à- dire un DAMM de 1 à 4 μm), ce qui est possible avec la plupart des substances d'essai à des concentrations de 2 mg/l. Les essais sur des aérosols à des concentrations supérieures à 2 mg/l ne sont tentés que si l'on peut obtenir des particules de taille respirable, voir document d'orientation 39 (2). Selon le règlement (CE) n° 1272/2008, il est déconseillé de réaliser des essais au-delà des concentrations limites pour des raisons de bien-être des animaux (3). Les essais au-delà de la concentration limite ne sont envisagés que s'il est très probable que leurs résultats présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé humaine (3), et une justification est alors fournie dans le rapport d'étude. En cas de substance potentiellement explosive, on prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de provoquer une explosion. Afin d'éviter le recours inutile à des animaux, un essai sans animaux est effectué avant l'essai à la concentration initiale pour s'assurer qu'il est possible d'atteindre dans la chambre les conditions expérimentales d'un essai à cette concentration.

38. Si une mortalité ou un état moribond sont observés à la concentration initiale, les résultats obtenus à cette concentration peuvent servir de point de départ pour les essais suivants à d'autres concentrations (voir étude principale). Si la concentration limite est impossible à atteindre du fait des propriétés physiques ou chimiques de la substance d'essai, c'est la concentration maximale pouvant être atteinte qui est testée. Si la létalité à cette concentration est inférieure à 50 %, il n'y a pas lieu de poursuivre l'essai. Si la concentration limite n'a pas pu être atteinte, une explication, étayée par des données, est fournie dans le rapport d'étude. Si la concentration maximale pouvant être atteinte pour une vapeur ne provoque pas de toxicité, il peut être nécessaire de produire la substance d'essai sous la forme d'un aérosol liquide.

▼M4

Étude principale pour le protocole C × t

39. La concentration initiale (session d'exposition I) (voir appendice 1) testée dans l'étude principale est soit une concentration limite, soit une concentration choisie par le directeur de l'étude sur la base d'une étude préliminaire. Si une mortalité a été observée pendant ou après la session I, l'exposition minimale (C × t) qui a provoqué la mortalité sert de guide pour déterminer la concentration et les périodes d'exposition pour la session II. Chaque session d'exposition suivante dépendra de la session précédente (voir appendice 1).

40. Pour de nombreuses substances d'essai, les résultats obtenus à la concentration initiale, plus ceux obtenus lors de trois sessions d'exposition supplémentaires sur une échelle de temps plus courte (la durée des périodes d'exposition successives suivant une progression géométrique de facteur $\sqrt{2}$), sont suffisants pour établir la relation de mortalité C × t (15). Nonobstant, il peut être utile de recourir à une cinquième concentration d'exposition [voir appendice 1 et document d'orientation 39 (2)]. Pour le traitement mathématique des résultats concernant le protocole C × t, voir appendice 1.

OBSERVATIONS

41. Un examen clinique des animaux est pratiqué régulièrement pendant la période d'exposition. Après l'exposition, des examens cliniques sont réalisés au minimum deux fois le jour de l'exposition, ou plus fréquemment suivant la réponse des animaux au traitement, et au minimum une fois par jour par la suite pendant une période de 14 jours. La durée de la période d'observation n'est pas fixée, mais est déterminée par la nature et le moment d'apparition des signes cliniques, ainsi que par la durée de la période de récupération. Les moments d'apparition et de disparition des signes de toxicité sont importants, en particulier quand on constate un certain retard dans l'apparition de ces signes. Toutes les observations sont systématiquement enregistrées individuellement pour chaque animal. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés pour des raisons de bien-être animal. Lors de l'examen clinique des signes de toxicité, il convient de veiller à ne pas confondre une piètre apparence initiale et des troubles respiratoires passagers, imputables à la procédure d'exposition, avec une toxicité de la substance d'essai qui impliquerait d'euthanasier les animaux plus tôt. Les principes et critères résumés dans le document d'orientation sur les effets mesurés éthiquement acceptables sont pris en considération, voir document d'orientation 19 (7). Quand des animaux sont retrouvés morts ou sont euthanasiés, l'heure de la mort est consignée le plus précisément possible.

42. Les observations quotidiennes portent notamment sur les modifications de la peau et des poils, des yeux et des muqueuses, mais aussi sur les changements affectant l'appareil respiratoire, le système circulatoire, les systèmes nerveux autonome et central, ainsi que l'activité somatomotrice et le comportement. Toute différentiation entre les effets locaux et systémiques est consignée autant que possible. Les tremblements, les convulsions, la salivation, les diarrhées, la léthargie, le sommeil et le coma doivent retenir l'attention. La mesure de la température rectale peut aider à mettre en évidence une bradypnée réflexe ou une hypo/hyperthermie liée au traitement ou au confinement.

Poids corporel

43. Le poids corporel de chacun des animaux est enregistré une fois lors de la période d'acclimatation, le jour de l'exposition (jour 0) juste avant celle-ci et au moins les jours 1, 3, et 7 (puis de façon hebdomadaire par la suite), ainsi qu'au moment de la mort ou de l'euthanasie, s'il est postérieur au jour 1. Le poids corporel est un indicateur critique reconnu de la toxicité, on surveille donc attentivement les animaux, dont le poids reste constamment inférieur de 20 %, ou plus à celui précédant l'étude. Les animaux survivants sont pesés et euthanasiés à la fin de la période postexposition.

▼M4

Pathologie

44. Tous les animaux d'expérience, y compris ceux morts au cours de l'essai ou euthanasiés et écartés de l'étude pour des raisons de bien-être animal, subissent une autopsie macroscopique. Lorsqu'un animal est découvert mort et que son autopsie n'est pas réalisable immédiatement, l'animal est réfrigéré (mais non congelé) à une température suffisamment basse pour minimiser l'autolyse. Les autopsies sont réalisées le plus tôt possible, en général dans un délai d'un à deux jours. Tous les changements macropathologiques sont enregistrés pour chaque animal en prêtant particulièrement attention aux voies respiratoires.

45. D'autres observations, ajoutées a priori à dessein, peuvent être envisagées afin d'élargir l'interprétation de l'étude, comme la mesure du poids pulmonaire des rats survivants et/ou la mise en évidence d'une irritation par examen de l'appareil respiratoire au microscope. Peuvent aussi être examinés les organes montrant une pathologie macroscopique chez les animaux survivant au moins 24 heures, et ceux pour lesquels une réaction au traitement est connue ou attendue. Un examen microscopique de l'intégralité de l'appareil respiratoire peut fournir des informations utiles pour les substances d'essai réactives à l'eau, comme les acides et les substances hygroscopiques.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

46. Pour chacun des animaux, le poids corporel et les conclusions de l'autopsie sont fournis. Les résultats des observations cliniques sont résumés sous la forme de tableaux et indiquer pour chaque groupe d'essai: le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes spécifiques de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, l'heure de la mort de chacun des animaux, la description et l'évolution dans le temps des effets toxiques ainsi que leur réversibilité, et les conclusions de l'autopsie.

Rapport d'essai

47. Le rapport d'essai contient, s'il y a lieu, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience et conditions d'élevage:

— description des conditions d'encagement, y compris: nombre (ou évolution du nombre) d'animaux par cage, matériel de litière, température ambiante et taux d'humidité relative, photopériode et identification du régime alimentaire,

— espèces/souches utilisées et justification éventuelle de l'utilisation d'une espèce autre que le rat,

— nombre, âge et sexe des animaux,

— méthode de randomisation,

— détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (notamment origine/type de régime alimentaire, origine de l'eau),

— description d'un éventuel conditionnement préalable à l'essai, tel que régime alimentaire, quarantaine ou traitement de maladie.

▼M4

Substance d'essai:

— nature physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (y compris isomérisation),

— données d'identification et numéro CAS (Chemical Abstract Services) s'il est connu.

Véhicule:

— justification de l'emploi d'un véhicule et justification de son choix (s'il ne s'agit pas de l'eau),

— données historiques ou concordantes démontrant que le véhicule n'interfère pas avec les résultats de l'étude.

Chambre d'inhalation:

— description de la chambre d'inhalation avec ses dimensions et son volume,

— source et description de l'équipement utilisé pour l'exposition des animaux et pour la production de l'atmosphère,

— équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité, la granulométrie et la concentration réelle,

— source de l'air, traitement de l'air fourni/évacué et système de climatisation utilisé,

— méthodes utilisées pour étalonner l'équipement afin d'assurer l'homogénéité de l'atmosphère d'essai,

— différence de pression (positive ou négative),

— orifices d'exposition par chambre («nez seul») ou emplacement des animaux dans la chambre («corps entier»),

— homogénéité/stabilité temporelle de l'atmosphère d'essai,

— situation des capteurs thermiques et hygrométriques et échantillonnage de l'atmosphère d'essai dans la chambre d'exposition,

— débits d'air, débit d'air par orifice d'exposition («nez seul») ou rapport du volume de l'animal à la chambre («corps entier»),

— informations sur l'équipement utilisé, le cas échéant, pour mesurer l'oxygène et le dioxyde de carbone,

— temps nécessaire pour atteindre l'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}),

— nombre de changements de volume par heure,

— doseurs (s'il y en a).

Données concernant l'exposition:

— justification du choix de la concentration cible dans l'étude principale,

— concentrations nominales (masse totale de la substance d'essai produite dans la chambre d'inhalation, divisée par le volume d'air traversant la chambre),

— concentrations réelles de la substance d'essai obtenues dans la zone où respirent les animaux; pour les mélanges à tester produisant des formes physiques hétérogènes (gaz, vapeurs, aérosols), chacun des constituants peut être analysé séparément,

▼**M4**

— toutes les concentrations atmosphériques sont rapportées en unités de masse (mg/l, mg/m^3, etc.); les unités de volume (ppm, ppb, etc.) peuvent aussi être indiquées entre parenthèses;

— répartition granulométrique des particules, diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) et écart type géométrique σ(g), ainsi que leur méthode de calcul. Les autres analyses de la taille de particules sont consignées.

Conditions expérimentales:

— détails sur la préparation de la substance d'essai, y compris sur les procédures utilisées pour réduire la taille des particules des matériaux solides ou pour préparer les solutions de la substance d'essai. Lorsque des procédés mécaniques sont susceptibles d'avoir altéré la composition de la substance d'essai, inclure les résultats des analyses effectuées pour vérifier la composition de la substance d'essai,

— description (si possible avec schéma) de l'équipement utilisé pour produire l'atmosphère d'essai et pour exposer les animaux à celle-ci,

— détails sur la méthode de chimie analytique utilisée et la méthode de validation (notamment rendement de récupération de la substance d'essai à partir du milieu d'échantillonnage),

— jutification du choix des concentrations d'essai.

Résultats:

— tableau présentant la température, le taux d'humidité et le débit d'air dans la chambre d'inhalation,

— tableau de données sur les concentrations nominales et réelles dans la chambre d'inhalation,

— tableau de données sur la taille des particules, notamment données analytiques sur le prélèvement d'échantillons, la répartition granulométrique et les calculs du DAMM et de σ_g,

— tableau de données sur les réponses et le niveau de concentration pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris de mortalité, et nature, sévérité, moment d'apparition et durée des effets),

— poids corporel de chacun des animaux enregistrés lors de l'essai, date et heure de leur mort si celle-ci intervient avant l'euthanasie prévue; moment d'apparition et évolution des signes de toxicité et, le cas échéant, leur réversibilité,

— pour chaque animal, résultats de l'autopsie et observations histopathologiques disponibles,

— estimations de la létalité (CL_{50}, DL_{01} par exemple), notamment limites de confiance à 95 % et pente (si elle est fournie par la méthode d'évaluation),

— relation statistique, y compris l'estimation du facteur n (pour le protocole C × t). Le nom du logiciel de statistiques utilisé est indiqué.

▼M4

Discussion et interprétation des résultats:

— un effort particulier est consacré à la description des méthodes utilisées pour répondre aux critères de la présente méthode d'essai, par exemple en ce qui concerne la concentration limite ou la taille des particules,

— la respirabilité des particules est abordée à la lumière des résultats d'ensemble, en particulier si les critères de taille des particules n'ont pu être remplis,

— une explication est apportée s'il a fallu euthanasier des animaux qui souffraient ou montraient des signes de détresse sévère et persistante, en se basant sur les critères du document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (8),

— si un essai suivant le chapitre B.52 de la présente annexe (4) a dû être interrompu en faveur de la présente méthode d'essai B.2, les justifications sont fournies,

— la cohérence des méthodes utilisées pour déterminer les concentrations nominales et réelles, et la relation entre la concentration réelle et la concentration nominale, sont incluses dans l'appréciation d'ensemble de l'étude,

— la cause probable de la mort et le mode d'action prédominant (systémique ou local) sont abordés.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) OCDE (2009). Toxicité aiguë par inhalation. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimique n° 403, OCDE Paris. Disponible sur l'internet (http://www.oecd.org/env/testguidelines).

(2) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 39, Paris. Disponible sur l'internet (http://www.oecd.org/env/testguidelines).

(3) Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006 (JO L 353 du 31.12.2008, p. 1).

(4) Chapitre B.52 de la présente annexe, Toxicité aiguë par inhalation – Méthode par classe de toxicité aiguë (ATC).

(5) Chapitre B.40 de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: Essai de résistance électrique transcutanée (RET).

(6) Chapter B.40 *bis* de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: Essai sur modèle de peau humaine.

(7) OCDE (2005). Méthode d'essai in vitro sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques n° 435, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (http://www.oecd.org/env/testguidelines).

(8) OCDE (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Évaluation. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 19, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (http://www.oecd.org/env/testguidelines).

(9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321-327.

(10) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼**M4**

(11) Pauluhn J. and Thiel A. (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167.

(12) Zwart J.H.E., Arts J.M., ten Berge W.F., Appelman L.M. (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278-290.

(13) Zwart J.H.E., Arts J.M., Klokman-Houweling E.D., Schoen E.D. (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105-117.

(14) Ten Berge W.F. and Zwart A. (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65-71.

(15) OCDE (2009), Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement - Série sur les essais et évaluations n° 104, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (http://www.oecd.org/env/testguidelines).

(16) Finney D.J. (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼M4

Appendice 1

Protocole C × t

1. Une étude séquentielle «Concentration × Temps» (C × t) peut constituer une alternative au protocole traditionnel lorsqu'il s'agit d'évaluer la toxicité par inhalation (12) (13) (14). Elle est privilégiée lorsqu'une réglementation particulière s'applique ou pour un besoin scientifique nécessitant des essais sur animaux portant sur des durées d'exposition multiples, par exemple à des fins d'établissement de plans d'intervention d'urgence ou d'aménagement du territoire. Cette approche débute en général avec un essai à la concentration limite (session d'exposition I) au cours duquel les animaux sont exposés à la substance d'essai pendant cinq périodes de durées différentes (15, 30, 60, 120 et 240 minutes par exemple) de façon à obtenir plusieurs durées d'exposition pour une même séance (voir figure 1). Lorsqu'on applique le règlement (CE) n° 1272/2008, les concentrations limites pour les gaz, les vapeurs et les aérosols sont respectivement de 20 000 ppm, 20 mg/l et 5 mg/l. Ces niveaux ne peuvent être dépassés que s'il est indispensable de réaliser des essais à ces niveaux de concentration pour des raisons règlementaires ou scientifiques (voir le paragraphe 37 de la méthode B.2).

2. Si l'on manque d'informations sur la toxicité de la substance d'essai, une étude préliminaire peut être réalisée, au cours de laquelle des groupes d'au maximum 3 animaux par sexe sont exposés à des concentrations cibles sélectionnées par le directeur de l'étude, en général sur une durée de 240 minutes.

3. Si une concentration limite est testée lors de la session d'exposition I et que l'on observe une mortalité inférieure à 50 %, il n'est pas nécessaire d'effectuer des essais supplémentaires. Si, pour des raisons règlementaires ou scientifiques, il est indispensable d'établir la relation concentration/temps/réponse pour des niveaux plus élevés que la concentration limite indiquée, l'exposition suivante est réalisée, par exemple, au double de la concentration limite (c'est-à-dire 2L dans la figure 1).

4. Si une toxicité est observée à la concentration limite, des essais supplémentaires (étude principale) sont nécessaires. Ces expositions supplémentaires sont réalisées soit à des concentrations plus faibles (dans la figure 1: sessions d'exposition II, III ou IV'), soit à des concentrations plus fortes sur des durées plus courtes (dans la figure 1, session d'exposition IV) qui sont adaptées et moins espacées.

5. L'essai (concentration initiale et concentrations supplémentaires) est réalisé avec l'animal de chaque sexe par point concentration/temps, ou avec 2 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai par point concentration/temps. Le directeur de l'étude peut choisir, dans certaines circonstances, d'utiliser 2 rats de chaque sexe par point concentration/temps, ou 4 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai par point concentration/temps (15). L'utilisation de 2 animaux par point concentration/temps réduit en général le biais et la variabilité des estimations, augmente le taux de succès de l'estimation et améliore la couverture de l'intervalle de confiance lié à ce protocole. Pour plus de détails, se reporter au document d'orientation 39 (2).

6. Idéalement, chaque session d'exposition est exécutée sur une seule journée, ce qui donne la possibilité de retarder l'exposition suivante jusqu'à ce qu'on soit raisonnablement sûr de la survie des animaux, et permet au directeur de l'étude d'ajuster la concentration cible et les durées pour la prochaine séance d'exposition. Il est recommandé de commencer chaque séance d'exposition avec le groupe qui sera exposé le plus longtemps, 240 minutes par exemple, suivi du groupe qui sera exposé 120 minutes, et ainsi de suite. Si, par exemple, les animaux du groupe exposé 240 minutes meurent après 90 minutes d'exposition ou montrent des signes importants de toxicité (par exemple, modifications considérables de la respiration, notamment difficultés respiratoires), il est inutile d'exposer un groupe pendant 120 minutes car la mortalité serait très vraisemblablement de 100 %. Le directeur de l'étude choisit alors des durées d'exposition plus courtes pour cette concentration (90, 65, 45, 33 et 25 minutes par exemple).

▼M4

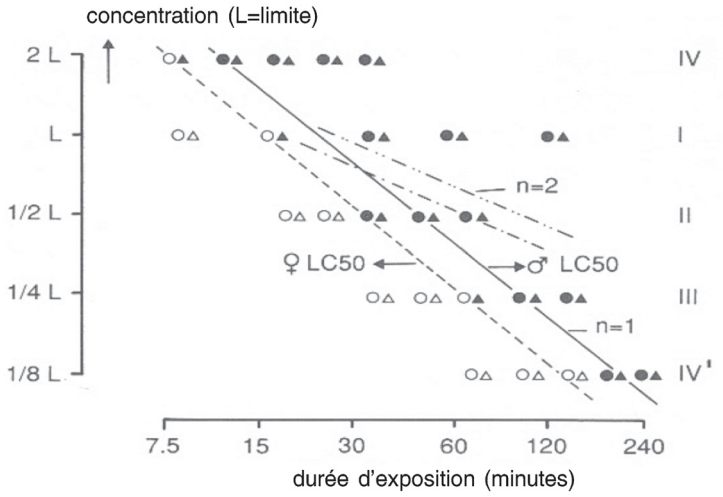
7. La concentration dans la chambre d'exposition est mesurée régulièrement pour déterminer la concentration moyenne pondérée en fonction du temps pour chaque durée d'exposition. Autant que possible, c'est l'heure de la mort de chaque animal qui est utilisée dans l'analyse statistique (et non la durée d'exposition).

8. Il convient d'examiner les résultats des quatre premières sessions d'exposition pour repérer les éventuelles données manquantes dans la courbe concentration-temps (voir figure 1). S'il manque effectivement des données, une exposition supplémentaire (5e concentration) peut être réalisée. La concentration et les durées d'exposition de cette 5e exposition sont choisies de manière à combler cette lacune.

9. Toutes les sessions d'exposition (y compris la première) seront utilisées pour calculer la relation concentration-temps-réponse au moyen d'une analyse statistique (16). On utilisera si possible, pour chaque intervalle C × t, la concentration moyenne pondérée en fonction du temps et la durée d'exposition jusqu'à la mort (si celle-ci intervient durant l'exposition).

Figure 1

Illustration hypothétique d'une relation concentration-temps-mortalité chez des rats



Symboles vides = survivants; symboles pleins = animaux morts

Triangles = femelles; cercles = mâles

Ligne pleine = valeurs de CL_{50} (de 7,5 à 240 minutes) pour les mâles, n = 1

Ligne tiretée = valeurs de CL_{50} (de 7,5 à 240 minutes) pour les femelles, n = 1

Lignes pointillées = valeurs de CL_{50} hypothétique pour les mâles et les femelles si n avait été égal à 2 (12).

Glossaire

concentration limite.

durée d'exposition.

▼M4

10. On trouvera ci-dessous un exemple de la procédure séquentielle:

Session d'exposition I – ***Essai à la concentration limite (voir figure 1)***

— 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total [a]

— Concentration cible [b] = concentration limite

— Exposer cinq groupes d'animaux à cette concentration cible pendant respectivement 15, 30, 60, 120 et 240 minutes.

↓

Session d'exposition II [c]**–** ***Étude principale***

— 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total.

— Exposer cinq groupes d'animaux à une concentration plus faible [d] (1/2L) pendant des durées légèrement plus longues (d'un facteur √2, voir figure 1).

↓

Session d'exposition III – ***Étude principale***

— 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total.

— Exposer cinq groupes d'animaux à une concentration plus faible [d] (1/4L) pendant des durées légèrement plus longues (d'un facteur √2, voir figure 1).

↓

Session d'exposition IV' – ***Étude principale***

— 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total.

— Exposer cinq groupes d'animaux à une concentration plus faible [d] (1/8L) pendant des durées légèrement plus longues (d'un facteur √2, voir figure 1).

↓ ou

---

[a] Si aucune information n'est disponible sur la sensibilité de chaque sexe à la substance d'essai, des rats des deux sexes seront utilisés, soit 1 animal de chaque sexe par concentration. À partir d'informations existantes ou s'il apparaît au cours de cette session d'exposition qu'un des sexes est plus sensible, 10 animaux de ce sexe seront utilisés (2 animaux par point concentration/temps) à chaque niveau de concentration pour les essais suivants.

[b] Lorsqu'on applique le règlement (CE) n° 1272/2008, les concentrations limites pour les gaz, les vapeurs et les aérosols sont respectivement de 20 000 ppm, 20 mg/l et 5 mg/l. Si l'on s'attend à une toxicité ou en raison des résultats de l'étude préliminaire, on choisit des concentrations de départ plus faibles. Pour des besoins règlementaires ou scientifiques, des concentrations plus fortes peuvent être utilisées.

[c] Idéalement, l'exposition des animaux au niveau de concentration suivant est retardée jusqu'à ce qu'on soit raisonnablement sûr que les animaux précédemment soumis au traitement ont survécu. Le directeur de l'étude peut alors ajuster la concentration cible et les durées pour la session d'exposition suivante.

[d] La dose minimale (concentration × temps) qui provoque la mortalité au cours de l'essai à la concentration initiale (première session d'exposition) servira de guide pour déterminer la prochaine combinaison de concentrations et de durées d'exposition. Généralement, la concentration diminuera de moitié (1/2L) et les animaux seront exposés sur une échelle de temps plus courte, les périodes d'exposition étant réparties selon une progression géométrique de facteur 1,4 (√2, voir référence 11) centrée sur le temps correspondant au niveau de la dose létale minimale (temps × concentration) observé lors de la première exposition. Dans la figure 1, la mortalité au cours de la Session d'exposition I a d'abord été observée au bout de 15 minutes; les durées de la Session II ont donc été centrées autour de 30 minutes et sont de 15, 21, 30, 42 et 60 minutes. Après les deux premières expositions, il est fortement recommandé de tracer les résultats dans un graphique similaire, comme indiqué ci-dessus, et de vérifier si la relation entre la concentration et le temps définit un angle de 45 degrés (n = 1) ou si la pente de la relation concentration-temps-réponse est moins forte (n = 2 par exemple) ou plus forte (n = 0,8 par exemple). Dans ces derniers cas, il est fortement recommandé d'adapter en conséquence les concentrations et les durées suivantes.

▼M4

Session d'exposition IV – *Étude principale*

— 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total.

— Exposer cinq groupes d'animaux à une concentration plus forte [e] (2L) pendant des durées légèrement plus longues (d'un facteur √2; voir figure 1).

Traitement mathématique des résultats pour le protocole C × t

11. Une procédure C × t constituée de 4 ou 5 concentrations d'exposition et de 5 durées d'exposition génère respectivement 20 ou 25 points de données. Avec ces points de données, la relation C × t peut être calculée à l'aide d'une analyse statistique (16):

Équation 1:

$$Probit(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

où C = concentration; t = durée d'exposition, ou

Équation 2:

$$Response = f(C^n t)$$

où $n = b_1/b_2$.

Avec l'équation 1, la valeur de la CL_{50} peut être calculée pour une période de temps donnée (par exemple, 4 heures, 1 heure, 30 minutes ou n'importe quelle période de temps comprise dans la plage des périodes de temps testées) avec P = 5 (50 % de réponse). À noter que la règle de Haber ne s'applique que lorsque n = 1. La CL_{01} est calculée avec P = 2,67.

[e] Dans certains cas, il peut être nécessaire d'augmenter la concentration (2L) sur une échelle de temps plus courte, les périodes d'exposition étant réparties selon une progression géométrique de facteur 1,4 (√2) centrée sur le temps correspondant au niveau de dose létale minimale observé lors de la première exposition. La durée minimale d'exposition est de préférence supérieure à 5 minutes et la durée maximale d'exposition ne dépasse pas 8 heures.

▼B

B.3. **TOXICITÉ AIGUË (CUTANÉE)**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. DÉFINITIONS

Voir introduction générale, partie B (point B).

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Des doses croissantes de la substance à tester sont appliquées sur la peau à plusieurs lots d'animaux d'expérience, une seule dose étant utilisée par lot. On observe ensuite les effets et la mortalité. Les animaux qui meurent pendant l'essai sont autopsiés ainsi que ceux qui survivent à la fin de l'expérience.

Si des animaux montrent des signes de détresse et de douleur intenses et durables, il peut être nécessaire de les euthanasier; il n'y a pas lieu d'effectuer l'essai lorsque l'on sait que l'administration de la substance à étudier entraîne une détresse ou des douleurs intenses du fait de ses propriétés corrosives ou irritantes.

1.5. CRITÈRE DE QUALITÉ

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.6.1. **Préparation**

Les animaux sont maintenus dans des conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience au minimum pendant les 5 jours qui la précèdent. Avant l'expérience, des animaux adultes jeunes et sains sont distribués selon les règles du hasard dans les différents lots d'expérience. Vingt-quatre heures environ avant l'épreuve, on tond ou l'on rase les poils de la région dorsale du tronc des animaux en évitant toute lésion de la peau susceptible de modifier sa perméabilité. La surface à préparer pour l'application de la substance ne doit pas être inférieure à 10 % de la surface corporelle. Lorsque le test concerne des substances solides qui, le cas échéant, peuvent être pulvérisées, la substance à tester doit être suffisamment humectée au moyen d'eau ou, au besoin, d'un véhicule approprié, de manière à assurer un bon contact avec la peau. Si l'on utilise un véhicule, son influence sur la pénétration de la substance dans la peau doit être prise en considération. Les substances liquides sont généralement appliquées non diluées.

1.6.2. **Conditions de l'essai**

1.6.2.1. Animaux d'expérience

On peut utiliser des rats ou des lapins adultes. On peut également utiliser d'autres espèces, mais il faut dans ce cas en justifier l'utilisation. Il faut utiliser des souches courantes d'animaux de laboratoire. Pour chaque sexe, au début de l'essai, l'intervalle de variation du poids des animaux utilisés ne doit pas excéder ± 20 % de la valeur moyenne requise.

▼B

1.6.2.2. Nombre et sexe

Cinq animaux au moins sont utilisés pour chaque dose. Ils doivent être de même sexe. Si l'on utilise des femelles, elles doivent être nullipares et non gravides. Si l'on dispose d'informations qui montrent qu'un sexe est nettement plus sensible, les essais seront pratiqués sur des animaux de ce sexe.

Note: Il faut essayer d'utiliser un nombre plus restreint d'animaux lorsque les tests de toxicité aiguë sont effectués sur des animaux appartenant à un ordre plus élevé que celui des rongeurs. Les doses doivent être soigneusement choisies, en s'efforçant au maximum de ne pas dépasser des doses modérément toxiques. Il faut éviter dans ce type d'essais d'administrer des doses létales de la substance à tester.

1.6.2.3. Doses

Les doses doivent être en nombre suffisant, au moins trois, et espacées de manière à produire des lots présentant une gamme d'effets toxiques et de taux de mortalité. Tout effet irritant ou corrosif doit être pris en considération lors du choix des doses. Les données doivent être suffisantes pour permettre de tracer une courbe doses/réponses et, si possible, permettre une détermination acceptable de la DL_{50}.

1.6.2.4. *Essai de limite*

Un essai de limite peut être effectué en administrant une dose au moins égale à 2 000 mg/kg de poids corporel à un lot de 5 mâles et 5 femelles, en suivant le mode opératoire décrit ci-après. Si l'on observe une mortalité due à la substance, il peut être nécessaire de réaliser une étude complète.

1.6.2.5. *Période d'observation*

La période d'observation doit s'étendre au moins sur 14 jours. Cependant, sa durée ne doit pas être limitée de façon rigide. Elle doit être déterminée en fonction des réactions de toxicité, de leur vitesse d'apparition et de la durée de la période de récupération; elle peut donc être prolongée en cas de besoin. Le moment où les signes de toxicité apparaissent et disparaissent, leur durée ainsi que le moment de la mort sont importants, surtout en cas de tendance à une mortalité retardée.

1.6.3. **Mode opératoire**

Les animaux doivent être placés dans des cages individuelles. La substance d'essai doit être appliquée uniformément sur une surface à peu près égale à 10 % de la surface totale du corps. Dans le cas de substances hautement toxiques, la surface traitée peut être moindre, mais la substance d'essai doit être appliquée de manière à former un film aussi mince et uniforme que possible.

Les substances d'essai doivent être maintenues en contact avec la peau au moyen d'un pansement de gaze poreux et d'un sparadrap non irritant pendant une période de 24 heures. La partie traitée doit, en outre, être convenablement couverte, de manière à maintenir en place le pansement de gaze et la substance d'essai et à éviter que les animaux puissent ingérer cette dernière. On peut utiliser des appareils de contention pour empêcher les animaux d'ingérer la substance d'essai mais une immobilisation complète n'est pas recommandée.

▼B

À la fin de la période d'application, la substance d'essai résiduelle doit être éliminée, si possible, avec de l'eau, ou au moyen d'un autre procédé de nettoyage de la peau.

Les observations doivent être consignées systématiquement au fur et à mesure qu'elles sont effectuées, en établissant une fiche individuelle pour chaque animal. Les animaux doivent être observés fréquemment le premier jour. Un examen clinique attentif doit être pratiqué au moins une fois par jour ouvrable, d'autres observations doivent être faites quotidiennement, en prenant des mesures de façon à réduire le nombre d'animaux perdus pour l'étude, par exemple autopsie ou conservation au froid des animaux trouvés morts, ainsi qu'en isolant et sacrifiant les animaux faibles ou moribonds.

Les observations doivent concerner les modifications des poils, de la peau traitée, des yeux, des muqueuses ainsi que de l'appareil respiratoire, du système circulatoire ainsi que des systèmes nerveux autonome et central, et enfin de l'activité somato-motrice et du comportement. Une attention particulière sera apportée aux tremblements, convulsions, salivation, diarrhées, léthargie, sommeil et coma. Le moment de la mort doit être enregistré avec autant de précision que possible. Les animaux qui meurent pendant l'expérience et ceux qui survivent à la fin de l'expérience sont autopsiés. Toutes les modifications pathologiques macroscopiques doivent être enregistrées. Si nécessaire, des tissus doivent être prélevés pour un examen histopathologique.

Estimation de la toxicité pour l'autre sexe

Après avoir mené à terme l'étude portant sur des animaux appartenant à un sexe, la substance est administrée au moins à un lot de 5 animaux de l'autre sexe, afin de déterminer si les animaux de ce sexe ne sont pas nettement plus sensibles à la substance à tester. L'utilisation d'un plus petit nombre d'animaux peut être justifiée dans des circonstances particulières. Si l'on dispose d'informations appropriées qui montrent que les animaux du sexe testé sont considérablement plus sensibles, on peut se dispenser d'effectuer des essais sur les animaux de l'autre sexe.

2. **DONNÉES**

Les données doivent être récapitulées sous forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le moment de la mort de chaque animal, le nombre d'animaux présentant d'autres signes d'intoxication, la description des effets toxiques et les résultats de l'autopsie. Le poids de chaque animal doit être déterminé et noté peu de temps avant l'application de la substance d'essai, puis une fois par semaine et au moment de la mort; les modifications du poids doivent être calculées et enregistrées lorsque la survie dépasse une journée. Les animaux qui sont euthanasiés à cause des souffrances et de l'inconfort dus à la substance sont enregistrés comme s'ils étaient morts du fait du composé étudié. La DL_{50} doit être déterminée par application d'une méthode reconnue.

L'évaluation des données doit inclure une évaluation de la relation, si elle existe, entre l'exposition des animaux à la substance à tester et l'apparition ainsi que la sévérité de toutes les anomalies, y compris les anomalies de comportement et les anomalies cliniques, les lésions macroscopiques, les modifications de poids corporel, la mortalité et tout autre effet toxique éventuel.

3. **RÉSULTATS**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

▼B

— espèce, souche, origine, conditions ambiantes, régime alimentaire, etc.,

— conditions expérimentales (y compris le procédé de nettoyage de la peau et le type de pansement: occlusif ou non),

— doses (avec indication du véhicule le cas échéant, et des concentrations),

— sexe des animaux sur lesquels l'essai a été réalisé,

— tableau de données de réponses par sexe et par dose (à savoir nombre d'animaux morts ou sacrifiés au cours de l'essai, nombre d'animaux présentant des symptômes d'intoxication, nombre d'animaux exposés),

— moment de la mort après administration, raisons et critères justifiant l'euthanasie des animaux,

— toutes les observations,

— valeur de la DL_{50} pour le sexe soumis à une étude complète, déterminée à 14 jours (en précisant la méthode de calcul),

— intervalle de confiance de 95 % pour la DL_{50}, lorsque le calcul est possible,

— courbe dose/mortalité et pente de cette courbe (lorsque la méthode de calcul le permet),

— résultats d'autopsie,

— toutes les constatations histopathologiques,

— résultats de tout essai réalisé sur l'autre sexe,

— discussion des résultats (en tenant compte, en particulier, de l'effet que peuvent avoir sur la valeur de la DL_{50} calculée les animaux euthanasiés au cours de l'essai),

— interprétation des résultats.

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B (point D).

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B (point E).

▼**M8**

B.4. **EFFET IRRITANT/CORROSIF AIGU SUR LA PEAU**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 404 (2015) de l'OCDE. Régulièrement mises à jour, les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques intègrent les meilleures données scientifiques disponibles. La révision de la ligne directrice 404 a porté plus particulièrement sur les possibilités d'améliorer le traitement des animaux de laboratoire et sur l'évaluation de toutes les informations existantes se rapportant aux produits chimiques testés en vue d'éviter les tests inutiles sur animaux. Cette nouvelle version de la ligne directrice 404 (initialement adoptée en 1981 et révisée en 1992, 2002 et 2015) comprend une référence au Document Guide sur les Approches Intégrées en matière d'Essai et d'Évaluation pour l'irritation et la corrosion de la peau (1). Ce Document Guide propose une approche modulaire pour les tests d'irritation et de corrosion de la peau. L'approche intégrée décrit plusieurs modules qui regroupent les sources d'information et les outils d'analyse, et i) fournit des guides sur la façon d'intégrer et d'utiliser les informations existantes sur les données d'essai et autres données pour l'évaluation du potentiel irritant et corrosif pour la peau des produits chimiques testés, et ii) propose une approche dans les cas où des tests supplémentaires sont recommandés (1). La présente méthode d'essai recommande également d'opter, si cela s'avère nécessaire, pour une application successive plutôt que simultanée des trois timbres sur l'animal dans l'essai *in vivo* initial.

2. Les définitions de l'irritation et de la corrosion cutanées sont données en annexe à cette méthode d'essai.

CONSIDÉRATIONS INITIALES

3. Pour assurer à la fois la fiabilité des résultats scientifiques et le bien-être animal, on ne procédera pas aux essais *in vivo* tant que toutes les données relatives au caractère éventuellement corrosif ou irritant pour la peau du produit chimique d'essai n'auront pas été évaluées au cours d'une analyse de leur valeur, telle que décrite dans le Document Guide sur les Approches Intégrées en matière d'Essai et d'Évaluation pour l'irritation et la corrosion de la peau (1), c'est-à-dire selon chacune des trois parties de ce Guide et de chacun des modules correspondants. De façon concise, la partie 1 couvre les données existantes reparties dans sept modules comprenant les données humaines *in vivo*, les données *in vitro*, les propriétés physico-chimiques (par exemple le pH, en particulier s'il est fortement acide ou alcalin) et les données autres que provenant d'essais. La partie 2 comprend une analyse des données existantes. Si cette analyse ne permet pas de conclure, la partie 3 doit être mise en œuvre avec des essais supplémentaires, en partant des essais *in vitro*, étant donné que les essais *in vivo* ne seront considérés qu'en dernier ressort. Cette analyse doit donc permettre de diminuer le recours aux essais *in vivo* de l'effet corrosif ou irritant sur la peau des produits chimiques pour lesquels des études précédentes ont déjà livré suffisamment d'informations quant à ces deux aspects.

PRINCIPE DE L'ESSAI IN VIVO

4. Une seule dose du produit chimique d'essai est appliquée sur la peau de l'animal choisi pour l'expérience, les zones non traitées de la peau de l'animal servant de témoin. L'expérimentateur observe et note selon une échelle de valeurs le degré d'irritation ou de corrosion à intervalles déterminés, et le décrit de façon plus détaillée afin de fournir une évaluation complète des effets. La durée de l'étude doit être suffisante pour permettre d'évaluer la réversibilité des effets observés.

▼M8

5. Les animaux qui manifestent des signes persistants de détresse et/ou de douleurs aiguës à n'importe quel stade de l'essai doivent être euthanasiés, et ces symptômes seront pris en compte dans l'évaluation du produit chimique d'essai. Les critères régissant la décision d'euthanasier les animaux moribonds et souffrants fortement sont exposés dans un autre document d'orientation (2).

PRÉPARATION DE L'ESSAI IN VIVO

Sélection de l'espèce animale

6. On choisira de préférence de jeunes adultes sains parmi les lapins albinos. L'utilisation d'une autre espèce sera justifiée, le cas échéant.

Préparation des animaux

7. Environ 24 heures avant l'essai, la région dorsale du tronc des animaux sera tondue à ras. On prendra soin de ne pas égratigner leur peau et seuls des animaux présentant une peau saine et intacte seront utilisés.

8. La fourrure de certaines souches de lapins est plus touffue par endroits et ce phénomène est plus marqué à certaines périodes de l'année. Ces plages à forte pilosité ne doivent pas recevoir la substance d'essai.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

9. Les animaux sont placés dans des cages individuelles. La température du local expérimental est réglée à 20 °C (±3 °C) pour les lapins. Si l'humidité relative doit atteindre au moins 30 pour cent sans excéder de préférence 70 pour cent, en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 pour cent. On appliquera un éclairage artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les lapins seront nourris avec un mélange classique pour animaux de laboratoire et boiront de l'eau potable à volonté.

MODE OPÉRATOIRE

Application de la substance d'essai

10. Le produit chimique d'essai est appliqué sur une petite zone (environ 6 cm^2) de la peau et recouverte par une compresse de gaze, assujettie au moyen d'un sparadrap non irritant. Si l'application directe est impossible (dans le cas de liquides ou de certaines pâtes, par exemple), le produit chimique d'essai est d'abord appliqué sur la compresse de gaze, laquelle est ensuite placée sur la peau. La compresse doit être maintenue en contact souple avec la peau à l'aide d'un pansement semi-occlusif durant la période d'exposition. Si le produit chimique d'essai est déposé sur la compresse, celle-ci doit être fixée sur la peau de façon à ce que le produit chimique soit réparti uniformément et entre bien en contact avec celle-ci. On fera en sorte que l'animal n'ait pas accès à la compresse et ne puisse ingérer ou inhaler le produit chimique d'essai.

11. Les produits chimiques liquides sont généralement testés à l'état non dilué. Si le produit chimique est solide (il peut être pulvérisé si nécessaire), il y a lieu de l'humidifier avec la plus petite quantité d'eau (ou au besoin d'un autre véhicule approprié) nécessaire à assurer un bon contact avec la peau. Lorsqu'on utilise un véhicule autre que l'eau, l'influence éventuelle du véhicule sur l'irritation de la peau par le produit chimique d'essai doit être minimale.

12. À la fin de la période d'exposition, qui dure normalement 4 heures, on enlève ce qui peut l'être du produit chimique d'essai restant, avec de l'eau ou un solvant approprié sans interférer avec la réaction ni altérer l'intégrité de l'épiderme.

▼M8

Dose

13. Une dose de 0,5 ml de liquide ou de 0,5 g de solide ou de pâte est appliquée sur la plage à tester.

Essai initial (essai d'irritation/corrosion cutanée *in vivo* sur un seul animal)

14. Dès lors qu'un produit chimique d'essai est jugé corrosif, irritant ou non classé d'après l'analyse des données existantes ou d'essais *in vitro* préalables, tout essai sur animal s'avère superflu. Toutefois, si l'on estime que des données supplémentaires sont nécessaires, le test *in vivo* est conduit initialement en utilisant un seul animal et en respectant la procédure suivante. Jusqu'à trois timbres d'essai sont appliqués successivement sur l'animal. Le premier timbre est enlevé après trois minutes. Si aucune réaction cutanée grave n'est constatée, un deuxième timbre est appliqué à un endroit différent et retiré après une heure. Si les observations effectuées à ce stade indiquent que l'exposition peut être étendue à quatre heures sans que cela fasse trop souffrir l'animal, l'expérimentateur appliquera un troisième timbre durant quatre heures et attribuera une cote à la réaction.

15. Si un effet corrosif est détecté à l'issue d'une des trois expositions séquentielles, l'essai s'achève immédiatement. Si aucun effet corrosif n'est relevé après l'enlèvement du troisième timbre, l'animal est gardé en observation durant 14 jours, à moins qu'un effet corrosif se déclare avant.

16. Dans les cas où l'on s'attend à ce que le produit chimique d'essai soit peut-être irritant, mais pas corrosif, un seul timbre sera appliqué sur un animal durant quatre heures.

Essai confirmatoire (essai d'irritation cutanée sur des animaux supplémentaires)

17. Si l'essai initial ne révèle aucun effet corrosif, il convient de confirmer la réaction irritante ou négative sur deux animaux supplémentaires, traités chacun avec un timbre maintenu durant quatre heures. Si l'essai initial produit un effet irritant, l'essai confirmatoire peut être conduit en mode séquentiel ou par l'exposition simultanée de deux animaux supplémentaires. Au cas exceptionnel où l'essai initial ne serait pas pratiqué, deux ou trois animaux peuvent être traités au moyen d'un seul timbre appliqué durant quatre heures. Si l'on utilise deux animaux et qu'ils expriment la même réaction, il n'est pas nécessaire de poursuivre l'essai. Dans le cas contraire, le troisième animal est également testé. L'utilisation d'animaux supplémentaires pourra être requise si les réactions sont équivoques.

Période d'observation

18. La durée de la période d'observation devrait être suffisante pour permettre d'évaluer complètement la réversibilité des effets observés. Il faudra cependant mettre fin à l'expérience dès que l'animal montre des signes persistants de douleur ou de détresse aiguës. La réversibilité des effets est déterminée par l'observation des animaux sur une période s'étendant jusqu'à 14 jours après l'enlèvement des timbres. Si la réaction s'avère réversible avant le quatorzième jour, l'expérience s'achève à ce moment-là.

Observations cliniques et cotation des réactions cutanées

19. L'observation des signes d'érythème et d'oedème chez tous les animaux et la cotation des réactions s'effectuent au bout de 60 minutes et ensuite 24, 48 et 72 heures après l'enlèvement du timbre. S'agissant de l'animal du test initial, la plage soumise à l'épreuve est aussi examinée immédiatement après l'enlèvement du timbre. Les réactions cutanées sont cotées et consignées conformément à l'échelle figurant dans le tableau ci-dessous. Si la peau présente des lésions qui n'accusent pas l'irritation ou la corrosion après 72 heures, il pourra être nécessaire d'observer l'animal jusqu'au quatorzième jour afin de

▼M8

déterminer la réversibilité des effets. En plus de l'observation de l'irritation, tous les effets toxiques locaux, tels que le dégraissage de la peau, et tout effet systémique nocif (par exemple, des effets se manifestant par des signes cliniques de toxicité et sur le poids corporel) doivent être relevés et décrits en détail. L'examen histopathologique est à envisager au cas où il faut éclaircir des réactions équivoques.

20. La cotation des réactions cutanées est forcément subjective. L'harmonisation de la cotation des réactions cutanées et l'appui aux laboratoires d'essai ainsi qu'au personnel chargé d'effectuer et d'interpréter les observations passent par une formation adéquate des expérimentateurs au système de cotation utilisé (voir tableau ci-dessous). Un manuel illustré sur la cotation de l'irritation cutanée et d'autres lésions pourrait être utile (10).

RÉSULTATS ET RAPPORT

21. Les résultats de l'étude devraient être récapitulés dans un tableau joint au rapport d'essai final et couvrir tous les aspects énumérés au paragraphe 24.

Évaluation des résultats

22. Le degré d'irritation cutanée devrait être évalué conjointement avec la gravité des lésions et leur caractère réversible. Les cotes individuelles ne fournissent pas une valeur absolue des propriétés irritantes d'une substance, celles-ci étant évaluées parallèlement à d'autres effets de la substance. En revanche, les cotes individuelles doivent être considérées comme des valeurs de référence, à évaluer en combinaison avec toutes les autres observations effectuées au cours de l'étude.

23. L'évaluation des réactions d'irritation doit tenir compte de la réversibilité des lésions cutanées. Si des réactions, telles que l'alopécie (sur une aire limitée), l'hyperkératose, l'hyperplasie et la desquamation, persistent jusqu'à la fin de la période d'observation de 14 jours, il y a lieu de considérer le produit chimique d'essai comme irritant.

Rapport d'essai

24. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Justification de l'essai in vivo:

— analyse de la valeur des résultats disponibles avant l'essai, notamment des résultats de la démarche expérimentale séquentielle;

— description des données pertinentes livrées par des essais précédents;

— données obtenues à chaque étape de la démarche expérimentale;

— description des essais *in vitro* effectués exposant le détail des procédures et les résultats obtenus avec les substances d'essai et de référence;

— comment l'analyse de la valeur des résultats a débouché sur la décision de conduire l'étude in vivo.

Produit chimique d'essai:

— substance mono-constituant:identification chimique, notamment désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent;

▼**M8**

— substance multi-constituants, substance de composition inconnue ou variable, produits réactionnels complexes et matériaux biologiques (UVCB) ou mélange: caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;

— apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;

— source et numéro de lot si disponible;

— traitement du produit chimique d'essai avant la conduite de l'essai, s'il y a lieu (par exemple chauffage, broyage);

— stabilité du produit chimique d'essai, date de péremption, ou date de vérification analytique si disponible;

— conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Véhicule:

— identification, concentration (s'il y a lieu), volume utilisé;

— justification du choix du véhicule.

Animaux d'expérience

— espèce/souche utilisée, justification de l'utilisation éventuelle d'un animal autre que le lapin albinos;

— nombre d'animaux de chaque sexe;

— poids de chaque animal au début et à la fin de l'essai;

— âge des animaux au début de l'essai;

— source des animaux, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.

Conditions expérimentales:

— technique de préparation du site d'application;

— détails concernant la composition du timbre et la technique d'application de ce dernier;

— détails sur la préparation, l'application et l'enlèvement du produit chimique d'essai.

Résultats:

— tableau faisant apparaître, pour chaque animal et à chaque relevé, les cotes attribuées aux réactions d'irritation/corrosion observées;

— description de toutes les lésions observées;

— description circonstanciée de la nature et du degré d'irritation ou de corrosion observé, et de tout effet histopathologique;

— description de tout autre effet local néfaste (par exemple le dégraissage de la peau) et des effets systémiques.

▼**M8**

Discussion des résultats.

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No. 203.) Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(2) OCDE (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as Endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998

(3) OCDE (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 19), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

▼**M8**

Tableau

Cotation des réactions cutanées

Formation d'érythème et d'escarre

Pas d'érythème…	0
Érythème très léger (à peine perceptible)…	1
Érythème bien défini…	2
Érythème modéré à grave…	3
Érythème grave (rouge violacé) à formation d'escarre empêchant la cotation de l'érythème…	4

Maximum possible: 4

Formation d'oedème

Pas d'oedème…	0
Oedème très léger (à peine perceptible)…	1
Oedème léger (pourtour de la zone oedémateuse bien délimité par une enflure nette)…	2
Oedème modéré (enflure d'environ 1 mm)…	3
Oedème grave (enflure de plus de 1 mm s'étendant au-delà de l'aire exposée)…	4

Maximum possible: 4

Un examen histopathologique pourra être conduit pour éclaircir des réactions douteuses.

▼**M8**

Appendice

DÉFINITIONS

Produit chimique: une substance ou un mélange.

L'irritation cutanée: apparition de lésions cutanées réversibles consécutives à l'application d'un produit chimique d'essai durant une période de quatre heures au maximum.

La corrosion cutanée: survenue de lésions cutanées irréversibles, et plus précisément d'une nécrose visible à travers l'épiderme et dans le derme, à la suite de l'application d'un produit chimique d'essai durant une période de quatre heures au maximum. La corrosion cutanée se manifeste par des ulcères, des saignements, des croûtes saignantes et, au terme de la période d'observation de 14 jours, par une décoloration due au pâlissement de la peau, des zones d'alopécie totale et des escarres. On envisagera un examen histopathologique s'il faut élucider des lésions douteuses.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai

▼M7

B.5. EFFET IRRITANT/CORROSIF AIGU SUR LES YEUX

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 405 (2012) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement réexaminées pour vérifier qu'elles intègrent les meilleures données scientifiques disponibles. Les précédents réexamens de cette méthode d'essai ont mis l'accent sur les possibilités d'éviter l'utilisation inutile des animaux de laboratoire afin de répondre aux préoccupations relatives au bien-être des animaux, moyennant l'évaluation préalable de toutes les informations existantes se rapportant aux produits chimiques d'essai. La ligne directrice 405 (adoptée en 1981 et mise à jour en 1987, 2002 et 2012) recommande d'analyser les résultats déjà disponibles en se fondant sur le poids de la preuve (1) avant d'envisager l'essai in vivo de l'effet irritant/corrosif aigu sur les yeux décrit dans cette ligne directrice. Il est conseillé de combler le manque de données par des essais séquentiels (2) (3). La stratégie d'essai inclut la réalisation d'essais in vitro validés et acceptés et est exposée dans un supplément à la présente méthode d'essai. Aux fins du règlement (CE) n° 1907/2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH) ([1]), une stratégie d'essai intégrée figure également dans le guide pertinent de l'ECHA (21). Les essais sur les animaux ne seront réalisés que s'ils s'avèrent nécessaires après examen des méthodes alternatives disponibles et mise en œuvre de celles jugées appropriées. À l'heure où la présente méthode d'essai est mise à jour, il existe encore des cas où le recours à cette méthode d'essai demeure indispensable ou est exigé par certains cadres réglementaires.

La mise à jour la plus récente concerne essentiellement l'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques sans changer le concept de base et la structure de la ligne directrice. L'ICCVAM ([2]) et un groupe international d'experts scientifiques indépendants ont examiné l'utilité et les limites d'un recours en routine à des anesthésiques topiques, des analgésiques systémiques et des effets mesurés éthiquement acceptables lors d'essais in vivo d'irritation oculaire (12). Ils ont conclu que l'utilisation d'anesthésiques topiques et d'analgésiques systémiques permettait d'éviter la majeure partie, voire la totalité, de la douleur et de la détresse des animaux sans modifier le résultat de l'essai, et recommandé que ces substances soient systématiquement utilisées. La présente méthode d'essai tient compte des conclusions de cet examen. Il convient donc que les anesthésiques topiques, analgésiques systémiques et effets mesurés éthiquement acceptables soient utilisés en routine dans le cadre des essais in vivo de l'effet irritant/corrosif aigu sur l'œil. Toute exception à cet égard devra être justifiée. Les raffinements décrits dans cette méthode allègeront considérablement ou éviteront la douleur et la détresse chez les animaux dans la plupart des cadres expérimentaux qui exigent encore un essai de sécurité oculaire in vivo.

Une gestion préventive et équilibrée de la douleur comprend: (i) un prétraitement en routine avec un anesthésique topique (p. ex. proparacaïne ou tétracaïne) et un analgésique systémique (p. ex. buprénorphine), (ii) un programme de traitement post-exposition en routine avec un analgésique systémique (p. ex. buprénorphine et méloxicam), (iii) un programme d'observation, de suivi et de consignation des signes cliniques de douleur et/ou de détresse chez les animaux, et (iv) un programme d'observation, de suivi et de consignation de la nature, de la gravité et de la progression de toutes les lésions oculaires. D'autres détails sont fournis dans les procédures mises à jour décrites ci-dessous. Après l'exposition au

([1]) Règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) n° 793/93 du Conseil et le règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission.

([2]) US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (Comité de coordination interagences sur la validation des méthodes alternatives, aux Etats-Unis)

▼M7

produit chimique d'essai, aucun anesthésique ou analgésique topique supplémentaire ne sera administré, de manière à éviter toute interférence avec l'essai. Les analgésiques dotés de propriétés anti-inflammatoires (comme le méloxicam) ne feront pas l'objet d'une application locale, et les doses systémiques employées ne devront pas perturber les effets sur l'œil.

Les définitions sont données dans l'appendice de la présente méthode d'essai.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

Dans le souci de concilier la fiabilité des résultats scientifiques et le bien-être animal, on ne procédera pas aux essais *in vivo* avant d'avoir évalué, par une analyse du poids de la preuve, toutes les données relatives au caractère potentiellement corrosif ou irritant du produit chimique pour les yeux. Ces données comprennent les résultats d'études existantes menées sur des humains et/ou des animaux de laboratoire, des données établissant l'effet corrosif ou irritant pour l'œil d'une ou plusieurs substances structurellement proches de la substance d'essai ou de mélanges de ces substances, des données démontrant la forte acidité ou alcalinité de la substance (4) (5), et des résultats d'essais *in vitro* ou *ex vivo* de corrosion cutanée et de corrosion/irritation oculaires validés et acceptés (6) (13) (14) (15) (16) (17). Les études peuvent avoir été conduites avant, ou à la suite de, l'analyse du poids de la preuve.

Pour certains produits chimiques, une telle analyse peut faire valoir la nécessité de mener des études *in vivo* du pouvoir corrosif/irritant pour l'œil du produit chimique. Le cas échéant, avant d'envisager un essai oculaire *in vivo*, il est préférable d'effectuer d'abord un essai *in vitro* et/ou *in vivo* de la corrosion cutanée induite par le produit chimique, et d'évaluer ces résultats conformément à la stratégie d'essai séquentielle de la méthode d'essai B.4 (7) ou à la stratégie d'essai intégrée décrite dans le guide de l'ECHA (21).

Une stratégie d'essai de type séquentiel, comportant des essais *in vitro* ou *ex vivo* de corrosion/irritation de l'œil validés, est décrite dans un supplément à la présente méthode d'essai et, aux fins de REACH, dans le guide de l'ECHA (21). Il est recommandé d'appliquer une telle stratégie d'essai avant de procéder à des essais *in vivo*. Pour les produits chimiques nouveaux, une stratégie d'essai par étapes est préconisée pour obtenir des données scientifiques fiables sur l'effet corrosif ou irritant du produit chimique. En ce qui concerne les produits chimiques existants pour lesquels les données sur l'effet corrosif ou irritant sur la peau et les yeux sont insuffisantes, il est possible de suppléer ces lacunes en appliquant cette stratégie. Le choix d'une autre stratégie d'essai ou la décision de ne pas procéder par étapes fait l'objet de justification.

PRINCIPE DE L'ESSAI *IN VIVO*

Après l'administration d'un analgésique systémique et l'induction d'une anesthésie topique adaptée, le produit chimique d'essai est appliqué en une seule dose sur un des yeux de l'animal d'expérience, l'œil non traité servant de témoin. On évalue le score de l'irritation ou de la corrosion oculaires en cotant la gravité des lésions affectant la conjonctive, la cornée et l'iris, à intervalles déterminés. Les autres réactions de l'œil et les troubles systémiques sont également décrits de manière à fournir une évaluation complète des effets. La durée de l'étude doit être suffisante pour permettre d'évaluer la réversibilité des effets.

Les animaux qui présentent des signes de douleur et/ou de détresse aiguës à tout stade de l'essai, ou des lésions correspondant aux effets mesurés éthiquement acceptables décrits dans la présente méthode d'essai (voir paragraphe 26) seront euthanasiés, et ces symptômes seront à prendre en compte dans l'évaluation du produit chimique d'essai. Les critères régissant la décision d'euthanasier les animaux moribonds et pris de fortes douleurs sont exposés dans un document d'orientation de l'OCDE (8).

▼M7

PRÉPARATION DE L'ESSAI *IN VIVO*

Choix des espèces

On choisira de préférence des lapins albinos et de jeunes adultes sains seront utilisés. L'utilisation d'une autre espèce ou souche fait l'objet de justification.

Préparation des animaux

Les deux yeux de chaque animal susceptible de participer à l'essai sont examinés dans les 24 heures précédant le début de l'essai. Les animaux qui présentent des signes d'irritation oculaire, des défauts oculaires ou une lésion de la cornée seront écartés.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

Les animaux sont placés dans des cages individuelles. La température du local expérimental est réglée à 20 °C (± 3 °C) pour les lapins. S'il convient que l'humidité relative atteigne au moins 30 % sans excéder de préférence 70 %, en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 %. L'éclairage est artificiel, avec une séquence alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. On évitera les éclairages trop intenses. Les lapins seront nourris avec un mélange classique pour animaux de laboratoire et boiront de l'eau potable à volonté.

MODE OPÉRATOIRE

Utilisation d'anesthésiques topiques et d'analgésiques systémiques

Les procédures suivantes sont recommandées pour réduire ou éviter la douleur et la détresse dans le cadre des essais de sécurité pour l'œil. On pourra faire appel à des procédures de remplacement dont il est avéré qu'elles sont aussi efficaces ou plus efficaces pour réduire ou éviter la douleur et la détresse des animaux.

— Soixante minutes avant l'application du produit chimique d'essai (APCE), les animaux reçoivent 0.01 mg/kg de buprénorphine par injection sous-cutanée (ISC) afin d'atteindre un niveau thérapeutique d'analgésie systémique. La buprénorphine et d'autres analgésiques opioïdes similaires administrés de façon systémique ne sont pas connus pour, ou suspectés de, modifier les lésions oculaires (12).

— Cinq minutes avant l'APCE, une ou deux gouttes d'anesthésique oculaire topique (p. ex. hydrochlorure de proparacaïne ou de tétracaïne à 0,5 %) sont appliquées sur chaque œil. Les anesthésiques topiques dénués d'agents conservateurs sont recommandés afin d'éviter toute interférence avec l'essai. L'œil de chaque animal non traité avec le produit chimique d'essai, mais qui reçoit l'anesthésique topique, joue le rôle de témoin. Si l'on suppose que le produit chimique d'essai peut entraîner une douleur et une détresse intenses, elle ne sera normalement pas testée *in vivo*. Néanmoins, quand un doute subsiste ou dans les cas où un tel essai est exigé, il convient d'envisager des administrations supplémentaires d'anesthésique topique toutes les 5 minutes, en amont de l'APCE. Les expérimentateurs doivent toutefois savoir que les applications multiples d'anesthésiques topiques sont susceptibles d'accroître légèrement la gravité des lésions induites par la substance chimique et/ou le délai de réversibilité de ces lésions.

— Huit heures après l'APCE, on injecte par voie sous-cutanée 0,01 mg/kg de buprénorphine et 0,5 mg/kg de méloxicam afin de maintenir l'analgésie systémique à un niveau thérapeutique. Bien qu'aucune donnée ne suggère d'effet anti-inflammatoire sur l'œil quand le méloxicam est injecté par voie sous-cutanée une fois par jour, on attendra au moins huit heures après l'APCE pour administrer ce produit afin d'éviter une interférence éventuelle avec l'essai (12).

— Après ce délai de 8 heures, on administre 0,01 mg/kg de buprénorphine par ISC toutes les 12 heures, parallèlement à un traitement au méloxicam à 0,5 mg/kg par ISC toutes les 24 heures, jusqu'à ce qu'une régression des lésions oculaires soit observée et qu'aucun signe clinique de douleur et de

▼M7

détresse ne se manifeste. Ces analgésiques sont disponibles dans des formes à libération prolongée, qui peuvent être envisagées pour réduire la fréquence d'administration d'analgésique.

— Un traitement analgésique «de secours» est effectué immédiatement après l'APCE lorsque l'analgésique et l'anesthésique topique administrés au préalable se révèlent inadaptés. Si un animal montre des signes de douleur ou de détresse en cours d'essai, une dose «de secours» de buprénorphine de 0,03 mg/kg sera immédiatement injectée par voie sous-cutanée puis répétée toutes les 8 heures (intervalle minimum), si nécessaire; cette posologie remplace les doses de 0,01 mg/kg par ISC toutes les 12 heures. La dose «de secours» de buprénorphine sera accompagnée de méloxicam à 0,5 mg/kg par ISC toutes les 24 heures, la première injection n'intervenant toutefois pas dans les 8 heures qui suivent l'APCE.

Application du produit chimique d'essai

L'expérimentateur introduit le produit chimique d'essai dans le cul-de-sac conjonctival d'un des deux yeux de chaque animal, après avoir délicatement écarté la paupière inférieure du globe oculaire. Il ramène ensuite délicatement les deux paupières l'une contre l'autre et les maintient dans cette position pendant environ une seconde afin d'éviter toute perte de substance. L'autre œil, qui ne subit pas de traitement, sert de témoin.

Irrigation

Il convient de ne pas laver les yeux des animaux traités pendant au moins 24 heures après l'instillation du produit chimique d'essai, à moins que celui-ci soit à l'état solide (voir paragraphe 18) ou déclenche immédiatement des effets corrosifs ou irritants. Au besoin, un lavage pourra être effectué à l'issue de ce délai.

L'utilisation d'un groupe d'animal satellite pour étudier l'influence du lavage n'est pas indiquée, à moins qu'elle ne se justifie d'un point de vue scientifique. Le cas échéant, on utilisera deux lapins. Les conditions du lavage sont décrites minutieusement: par exemple le moment du lavage, la composition et la température de la solution ophtalmique, la durée, le volume et la vitesse d'application.

Niveau de dose

(1) *Essais sur des liquides*

Pour les liquides, on utilise une dose de 0,1 ml. Il convient d'éviter d'instiller le produit chimique directement dans l'œil avec un vaporisateur à pression; il est préférable d'expulser d'abord le produit chimique dans une fiole, d'en prélever 0,1 ml et de l'instiller dans l'œil.

(2) *Essais sur des solides*

Dans le cas des solides, pâtes ou substances particulaires, la quantité utilisée a un volume de 0,1 ml ou un poids ne dépassant pas 100 mg. Le produit chimique d'essai sera broyé finement. Il convient de mesurer le volume de la substance solide après l'avoir légèrement tassée, par exemple en tapotant le récipient de mesure. Si le produit chimique d'essai solide n'a pas encore été évacué de l'œil de l'animal par des mécanismes physiologiques au premier moment d'observation, à savoir une heure après le traitement, l'œil peut être rincé à l'aide d'une solution saline ou à l'eau distillée.

(3) *Essais sur des aérosols*

Il est recommandé de prélever une dose du contenu de tous les vaporisateurs à pression et aérosols avant de l'instiller dans l'œil. La seule exception concerne les produits chimiques conditionnés en bombes aérosol sous pression, qui sont impossibles à recueillir préalablement à l'instillation car ils se vaporisent. Dans ce cas, l'expérimentateur maintient l'œil de l'animal ouvert et administre le produit chimique à tester en un seul jet d'environ une seconde, émis à 10 cm et directement en face de l'œil. Cette distance peut être modulée en fonction de la pression du jet et de sa composition. Il convient de veiller à ce que la pression du jet n'endommage pas l'œil. Dans certains cas, il pourra être nécessaire d'évaluer l'ampleur des dégâts «mécaniques» risquant d'être causés à l'œil par la force du jet.

▼M7

La dose d'aérosol peut être estimée grâce à une simulation de l'application menée comme suit: le produit chimique est projeté sur du papier pour pesée à travers une ouverture de la taille d'un œil de lapin placée directement devant le papier. L'augmentation du poids du papier donne une idée approximative de la quantité administrée à l'œil de lapin. Pour un produit volatile, la dose peut être estimée à partir du poids du récipient (dans lequel elle est contenue) avant et après utilisation.

Essai initial (essai in vivo de l'effet irritant/corrosif sur les yeux mené sur un seul animal)

Il est fortement recommandé de commencer par pratiquer l'essai *in vivo* sur un seul animal (voir le supplément à la présente méthode d'essai: Stratégie d'essai séquentielle pour les essais d'irritation et de corrosion oculaires). Les observations qui en découlent doivent permettre de déterminer la gravité et la réversibilité des lésions avant de mettre en œuvre un essai de confirmation avec un animal supplémentaire.

Si les résultats de cet essai, mené selon la procédure décrite, indiquent que le produit chimique est corrosif ou fortement irritant pour l'œil, il n'y a pas lieu de mener d'autres essais d'irritation oculaire.

Essai de confirmation (essai d'irritation oculaire in vivo conduit sur des animaux supplémentaires)

Si l'essai initial ne révèle aucun effet corrosif ou fortement irritant, il convient de confirmer la réaction irritante ou négative sur un ou deux animaux supplémentaires. Si l'essai initial produit un effet irritant, il est recommandé de conduire l'essai de confirmation sur un mode séquentiel en n'utilisant qu'un seul animal à la fois, plutôt que d'exposer les deux animaux simultanément. Si le deuxième animal manifeste des signes de corrosion ou de forte irritation, l'essai s'arrête là. Si les résultats de l'essai sur le deuxième animal suffisent à déterminer la catégorie de danger de la substance, l'essai s'arrête là.

Période d'observation

La durée de la période d'observation doit être suffisante pour permettre d'évaluer entièrement l'ampleur et la réversibilité des effets observés. Il convient cependant de mettre un terme à l'essai dès qu'un animal manifeste des signes de détresse ou de douleur aiguë (8). Pour déterminer la réversibilité des effets, les animaux sont normalement observés durant 21 jours après l'exposition au produit chimique d'essai. Si la réversibilité est constatée avant ce délai, l'expérience prend fin à ce moment-là.

Observations cliniques et cotation de la gravité des réactions oculaires

Les yeux font l'objet d'un examen complet pour repérer d'éventuelles lésions oculaires une heure après l'APCE, puis cette procédure est répétée au moins une fois par jour. Les trois premiers jours qui suivent l'exposition, on examinera les animaux plusieurs fois par jour afin de pouvoir mettre un terme à l'essai en temps opportun, s'il y a lieu. Les animaux sont soumis à des examens de routine tout au long de l'essai pour rechercher des signes cliniques de douleur et/ou de détresse (p. ex. coups de patte ou frottements de l'œil répétés, cillement excessif, larmoiement excessif) (9) (10) (11), au moins deux fois par jour à six heures d'intervalle minimum, ou plus fréquemment si besoin est. Ces examens sont nécessaires pour (i) évaluer correctement les signes de douleur et de détresse des animaux afin d'établir la nécessité d'augmenter le dosage des analgésiques en conséquence et (ii) déterminer si les effets mesurés éthiquement acceptables sont atteints, de manière à décider en connaissance de cause d'euthanasier ou non les animaux et veiller à ce que les décisions d'euthanasier soient prises en temps voulu. Pour faciliter la détection et la mesure des lésions oculaires et déterminer si les effets observés éthiquement acceptables motivant l'euthanasie ont été atteints, on utilisera une coloration à la fluorescéine en routine ainsi qu'un biomicroscope (lampe à fente), si nécessaire (p. ex. pour évaluer la profondeur de la lésion en cas d'ulcération cornéenne). Des photographies numériques des lésions

▼M7

observées pourront être collectées à titre de référence et pour garder une trace permanente attestant l'étendue de la lésion oculaire. Les animaux ne seront maintenus dans l'essai que le temps nécessaire pour obtenir un résultat définitif. Ceux qui manifestent des signes de douleur ou de détresse aiguë sont euthanasiés immédiatement, et ces symptômes sont à prendre en compte dans l'évaluation du produit chimique d'essai.

Il convient également d'euthanasier les animaux qui présentent les lésions oculaires suivantes à la suite de l'instillation (voir le tableau 1 pour une description des scores des lésions): une perforation de la cornée ou une ulcération profonde de la cornée associée à un staphylome; la présence de sang dans la chambre antérieure de l'œil; une opacité cornéenne de niveau 4; l'absence de réflexe photomoteur (réaction iridienne de niveau 2) durant 72 heures; l'ulcération de la membrane conjonctivale; une nécrose des conjonctives ou de la membrane nictitante; ou un décollement du tissu nécrosé. Et ce, parce que ces lésions sont généralement irréversibles. Il est par ailleurs recommandé de considérer les lésions oculaires suivantes comme des effets mesurés éthiquement acceptables, dont la survenue motive l'arrêt d'un essai avant la période d'observation de 21 jours prévue. On estime que ces lésions en annoncent d'autres symptomatiques d'un effet corrosif ou fortement irritant, ou qui ne seront que partiellement réversibles dans le délai d'observation de 21 jours: lésions très profondes (p. ex. une ulcération cornéenne qui dépasse les couches superficielles du stroma), destruction du limbe > 50 % (traduite par un blanchiment du tissu conjonctival) et infection oculaire aiguë (écoulement purulent). Une vascularisation de la surface cornéenne (c'est-à-dire un pannus) associée à une surface colorée à la fluorescéine qui ne diminue pas au fil des examens quotidiens et/ou à l'absence de réépithélialisation 5 jours après l'application du produit chimique d'essai peuvent aussi constituer un faisceau de critères utiles pour justifier la décision clinique de mettre un terme à l'essai prématurément. Cependant, chacun de ces résultats pris isolément ne suffit pas à motiver l'arrêt prématuré de l'essai. Dès que des effets graves sur l'œil sont observés, il convient de faire appel à un vétérinaire traitant ou spécialisé dans les animaux de laboratoire, ou à du personnel formé à identifier les lésions cliniques, pour mener un examen clinique permettant de juger si l'association de ces réactions implique un arrêt prématuré de l'essai. On attribuera un score aux réactions oculaires (des conjonctives, de la cornée et de l'iris) 1, 24, 48 et 72 heures après l'application du produit chimique d'essai, et les résultats seront consignés (tableau 1). Les animaux qui ne présentent pas de lésions oculaires peuvent être écartés, mais seulement à partir du quatrième jour suivant l'instillation. Les animaux dont les lésions ne sont pas sévères demeurent en observation jusqu'à la disparition de ces lésions, ou pendant 21 jours, après quoi l'essai prend fin. Ces observations sont effectuées et consignées au moins à 1, 24, 48, 72 heures, puis 7, 14 et 21 jours après l'APCE afin de déterminer l'état des lésions ainsi que leur réversibilité ou leur irréversibilité. Il est parfois nécessaire de rapprocher les examens pour déterminer s'il convient d'euthanasier un animal pour des raisons éthiques ou de l'écarter de l'essai du fait de résultats négatifs.

Le niveau des lésions oculaires (tableau 1) est consigné à chaque examen. Toutes les autres lésions oculaires (p. ex. pannus, coloration, modifications de la chambre antérieure) et les troubles systémiques sont également signalés.

Pour examiner les réactions, on peut s'aider d'une loupe binoculaire, d'une lampe à fente portative, d'un biomicroscope ou d'un autre appareil approprié. Après l'enregistrement des observations effectuées à la vingt-quatrième heure, l'examen des yeux peut se poursuivre à la fluorescéine.

L'attribution de score aux réactions oculaires est inévitablement subjective. L'harmonisation de l'attribution de scores aux réactions oculaires et l'appui aux laboratoires d'essai ainsi qu'au personnel chargé d'effectuer et d'interpréter les observations passent par une formation adéquate des expérimentateurs au système de score utilisé.

▼M7

RÉSULTATS ET RAPPORTS

Évaluation des résultats

Les scores d'irritation oculaire doivent être évalués en considération de la nature et de la gravité des lésions ainsi que de leur caractère réversible ou non. Les scores individuels ne sont pas un critère absolu de propriétés irritantes d'un produit chimique, car d'autres effets du produit chimique sont également évalués. En revanche, les scores individuels ont une valeur de référence et ne sont significatifs que lorsqu'ils sont étayés par une description et une évaluation complètes de toutes les observations.

Rapport d'essai

Le rapport d'essai comporte les informations suivantes:

Justification de l'essai in vivo: analyse fondée sur le poids de la preuve des résultats d'essais préexistants, notamment ceux qui procèdent de la stratégie d'essai séquentielle:

— description des résultats pertinents d'essais précédents;

— données obtenues à chaque étape de la stratégie d'essai;

— description des essais effectués *in vitro* détaillant les procédures et mentionnant les résultats obtenus avec les produit chimique d'essai et de référence;

— description de l'étude d'irritation/corrosion cutanée menée *in vivo* mentionnant les résultats obtenus;

— comment l'analyse fondée sur le poids de la preuve des résultats disponibles a débouché sur la décision de conduire l'étude *in vivo*.

Produit chimique d'essai:

— données d'identification (par exemple nom chimique et si possible numéro CAS, pureté, impuretés connues, source, numéro de lot);

— état physique et propriétés physico-chimiques (p. ex., pH, volatilité, solubilité, stabilité, réactivité avec l'eau);

— s'il s'agit d'un mélange, les composants sont identifiés, et les données d'identification des substances constituant le mélange (par exemple les noms et, s'ils sont disponibles, les numéros CAS) et leurs concentrations sont fournies;

— dose appliquée.

Véhicule:

— identification, concentration (s'il y a lieu), volume utilisé;

— justification du choix du véhicule.

Animaux d'essai:

— espèce/souche utilisée, justification de l'utilisation éventuelle d'un animal autre que le lapin albinos;

— âge de chaque animal au début de l'essai;

— nombre d'animaux de chaque sexe dans les groupes d'essai et témoin (le cas échéant);

— poids de chaque animal au début et à la fin de l'essai;

— source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.

▼M7

Anesthésiques et analgésiques

— doses d'anesthésiques topiques et d'analgésiques systémiques administrés, et chronologie d'administration;

— si on a eu recours à un anesthésique local: identification, pureté, type et interaction potentielle avec le produit chimique d'essai.

Résultats:

— description de la méthode utilisée pour coter l'irritation à chaque moment d'observation (p. ex. lampe à fente portative, biomicroscope, fluorescéine);

— présentation sous forme de tableaux des réactions d'irritation ou de corrosion relevées chez chaque animal et à chaque moment d'observation jusqu'à la fin de la participation de chaque animal à l'essai;

— description circonstanciée du degré et de la nature de l'irritation ou de la corrosion observées;

— description de toute autre lésion notée dans l'œil (p. ex. vascularisation, formation d'un pannus, adhésions, coloration);

— description des effets non oculaires locaux et des troubles systémiques, enregistrement des signes cliniques de douleur et de détresse, photographies numériques et observations histopathologiques, le cas échéant.

Discussion des résultats

Interprétation des résultats

L'extrapolation à l'humain des résultats d'études d'irritation oculaire menées sur des animaux de laboratoire n'est valable que dans une certaine mesure. Dans bien des cas, le lapin albinos est plus sensible que l'espèce humaine aux substances irritantes ou corrosives pour l'œil.

Lors de l'interprétation des résultats, il faut savoir reconnaître une irritation consécutive à une infection secondaire, laquelle ne devra pas être prise en compte.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Barratt, M.D. et autres (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8, ATLA 23, 410 — 429.

(2) de Silva, O. et autres (1997), Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies, *Food Chem. Toxicol* 35, 159 — 164.

(3) Worth A.P. et Fentem J.H. (1999), A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161 — 177.

(4) Young, J.R. et autres (1988), Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals, *Toxicol.* In Vitro, 2, 19 — 26.

(5) Neun, D.J. (1993), Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH, *J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol*. 12, 227 — 231.

(6) Fentem et autres (1998), The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity, 2. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicology* in Vitro 12, pp.483 — 524.

(7) Chapitre B.4 de la présente annexe, *Toxicité aiguë: irritation/corrosion cutanée.*

▼M7

(8) OCDE (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation n° 19 (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

(9) Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. (1985), Animal pain: evaluation and control, *Lab Animal*. Mai/juin: 20-36.

(10) Conseil national de la recherche des États-Unis (NRC) (2008), Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Washington, DC: National Academies Press.

(11) Conseil national de la recherche des États-Unis (NRC) (2009), Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, Washington, DC: National Academies Press.

(12) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing, NIH Publication No. 10-7514, Research Triangle Park, NC, USA:National Institute of Environmental Health Sciences.

Disponible à l'adresse http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest- TMER.htm

(13) Chapitre B.40 de la présente annexe, *Corrosion cutanée in vitro: Essai de résistance électrique transcutanée (RET).*

(14) Chapitre B.40 bis de la présente annexe, *Corrosion cutanée in vitro: essai sur modèle de peau humaine.*

(15) OCDE (2006), *Essai n° 435: Méthode d'essai in vitro sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE. doi: 10.1787/9789264067325-fr

(16) Chapitre B.47 de la présente annexe, Méthode d'essai d'opacité et de perméabilité de la cornée bovine pour l'identification i) des produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves et ii) des produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave.

(17) Chaptitre B.48 de la présente annexe, Méthode d'essai sur œil de poulet isolé pour l'identification i) des produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves et ii) des produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave.

(18) U.S. EPA (2003), Label Review Manual: 3rd Edition. EPA737-B-96-001, Washington, DC: Agence de protection de l'environnement des États-Unis.

(19) ONU (2011), Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (SGH), quatrième édition révisée, New York & Genève: Publications des Nations Unies.

(20) CE (2008), Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006, Journal Officiel des Communautés Européennes L353, 1-1355.

(21) ECHA Guide des exigences d'information et évaluation de la sécurité chimique, Chapitre R.7a: Informations spécifiques aux effets.

http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

Tableau 1

Cotation des lésions oculaires

Cornée	Score
Opacité: degré de densité (les observations porteront sur les zones les plus denses) (*)	
Pas d'ulcération ni d'opacité	0
Zones d'opacité (autres qu'un léger ternissement de l'éclat normal) dispersées ou diffuses; détails de l'iris nettement visibles	1
Zone translucide aisément discernable; détails de l'iris légèrement masqués	2
Zone nacrée; détails de l'iris complètement invisibles; dimension de la pupille à peine discernable	3
Cornée opaque; iris non discernable à travers l'opacité	4
Maximum possible: 4	
Iris	
Normal	0
Plis nettement plus profonds, congestion, tuméfaction, hyperhémie péricornéenne modérée ou conjonctives injectées; iris réactif à la lumière (une réaction lente est considérée positive)	1
Hyperhémie de certains vaisseaux sanguins (yeux injectés)	2
Maximum possible: 2	
Conjonctives	
Rougeur (s'applique aux conjonctives palpébrale et bulbaire, mais pas à la cornée ni à l'iris)	
Normal	0
Hyperhémie de certains vaisseaux sanguins (yeux injectés)	1
Coloration pourpre diffuse, vaisseaux sanguins difficilement discernables les uns des autres	2
Coloration rouge soutenu diffuse	3
Maximum possible: 3	
Chémosis	
Tuméfaction (s'applique aux paupières et/ou aux membranes nictitantes)	
Normal	0
Tuméfaction légèrement supérieure à la normale	1
Tuméfaction patente avec éversion partielle des paupières	2
Tuméfaction avec paupières à demi closes	3
Tuméfaction avec paupières plus qu'à demi closes	4
Maximum possible: 4	

(*) L'étendue de l'opacité cornéenne est précisée

▼**M7**

Appendice

DÉFINITIONS

Réserve acide/alcaline: pour les préparations acides, quantité (g) d'hydroxyde de sodium/100 g de préparation nécessaire pour obtenir un pH déterminé. Pour les préparations basiques, il s'agit de la quantité (g) d'hydroxyde de sodium qui équivaut à la masse (g) d'acide sulfurique/100 g de préparation nécessaire pour obtenir un pH déterminé (Young et al. 1988).

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Substance non irritante: substance qui n'est pas classée comme irritant oculaire au sens des catégories I, II ou III de l'EPA, des catégories 1, 2, 2A, ou 2B du SGH ou de la catégorie 1 ou 2 de l'UE (17) (18) (19).

Produit chimique corrosif pour l'œil: (a) produit chimique provoquant des lésions irréversibles des tissus oculaires; (b) produit chimique classé comme irritant oculaire au sens de la catégorie 1 du SGH, de la catégorie 1 de l'EPA ou de la catégorie 1 de l'UE (17) (18) (19).

Produit chimique irritant pour l'œil: (a) produit chimique provoquant une modification réversible de l'œil; (b) produit chimique classé comme irritant oculaire au sens des catégories II ou III de l'EPA, des cartégories 2, 2A ou 2B du SGH ou de la catégorie 2 de l'UE(17) (18) (19).

Produit chimique fortement irritant pour l'œil: (a) produit chimique provoquant des lésions tissulaires de l'œil qui ne sont pas réversibles dans les 21 jours suivant l'application ou entraînent une dégradation sévère de la vision; (b) produit chimique classé comme irritant oculaire au sens de la catégorie 1 du SGH, de la catégorie 1 de l'EPA ou de la catégorie I de l'UE (17) (18) (19).

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Stratégie à plusieurs niveaux: stratégie d'essai séquentielle consistant à examiner toutes les informations existantes sur un produit chimique d'essai dans un ordre déterminé, en ayant recours à chaque étape à un processus d'analyse du poids de la preuve pour déterminer si les informations disponibles sont suffisantes pour décider d'une classification dans une catégorie de danger, avant de passer à l'étape suivante. Si le potentiel d'irritation d'un produit chimique d'essai peut être déterminé sur la base des informations existantes, aucun essai supplémentaire n'est nécessaire. Dans le cas contraire, une procédure expérimentale progressive de type séquentiel sur des animaux est alors lancée jusqu'à ce qu'une classification sans équivoque puisse être effectuée.

Poids de la preuve: procédé consistant à prendre en compte les forces et les faiblesses de divers éléments d'information pour aboutir à une conclusion concernant les dangers potentiels d'un produit chimique et étayer cette conclusion.

▼M7

SUPPLÉMENT À LA MÉTHODE D'ESSAI B.5 ([1])

DÉMARCHE EXPERIMENTALE SEQUENTIELLE POUR LES ESSAIS D'IRRITATION ET DE CORROSION OCULAIRES

Généralités

Pour concilier la fiabilité des résultats scientifiques et le bien-être animal, il importe d'éviter l'utilisation abusive d'animaux d'expérience et de réduire au minimum toute procédure expérimentale susceptible de déclencher des effets graves chez les animaux. Avant d'envisager un essai *in vivo*, on évaluera toutes les informations relatives à l'éventuel effet corrosif/irritant d'un produit chimique sur les yeux. Il se peut que les données disponibles suffisent à classer le produit chimique d'essai quant à son pouvoir irritant ou corrosif pour les yeux, sans qu'il soit nécessaire d'effectuer des essais sur animaux. Ainsi, le recours à l'analyse du poids de la preuve et l'adoption d'une stratégie d'essai séquentielle limiteront au maximum la nécessité de pratiquer des essais *in vivo*, surtout si le produit chimique risque d'engendrer des réactions violentes.

Il est recommandé d'évaluer les informations existantes concernant le pouvoir irritant ou corrosif des produits chimiques pour les yeux en se fondant sur le poids de la preuve, afin d'établir la nécessité de réaliser des études supplémentaires, autres que des études oculaires *in vivo*, pour contribuer à caractériser ce pouvoir. Si cette nécessité se confirme, une démarche expérimentale séquentielle est préconisée pour produire les données expérimentales pertinentes. S'agissant des substances qui n'ont pas encore fait l'objet d'essais, il convient d'obtenir l'ensemble des données permettant d'évaluer le pouvoir corrosif ou irritant de la substance par une démarche séquentielle. La stratégie d'essai initiale décrite dans le présent supplément a été conçue lors d'un atelier de l'OCDE (1). Elle a ensuite été confirmée et étendue dans le Système harmonisé de classification intégrée des risques pour la santé humaine et l'environnement liés aux substances chimiques, adoptée par la vingt-huitième Réunion conjointe du Comité sur les produits chimiques et du Groupe de travail sur les produits chimiques en novembre 1998 (2), et mise à jour par un groupe d'experts de l'OCDE en 2011.

Si cette stratégie d'essai séquentielle ne fait pas partie intégrante de la méthode d'essai B.5, elle constitue cependant la procédure recommandée pour déterminer l'effet irritant ou corrosif sur les yeux. Cette procédure représente à la fois la meilleure pratique et une référence éthique pour les essais *in vivo* dans ce domaine. La méthode d'essai décrit le mode opératoire de l'essai *in vivo* et récapitule les facteurs qui devraient être examinés avant d'entamer l'essai. La stratégie d'essai séquentielle indique comment évaluer les données existantes relatives aux propriétés irritantes ou corrosives des produit chimique pour l'œil en se fondant sur le poids de la preuve, et présente une stratégie à plusieurs niveaux permettant d'obtenir des données pertinentes sur les produits chimiques qui réclament d'autres études ou qui n'ont pas encore été étudiés. Cette démarche prescrit également de commencer par conduire des essais *in vitro* ou *ex vivo* validés et acceptés, puis, dans certaines circonstances, d'effectuer les études d'irritation/corrosion cutanées exposées dans la méthode d'essai B.4 (3) (4).

Description de la stratégie d'essai par étapes

Avant d'entreprendre les essais inscrits dans la démarche expérimentale séquentielle (graphique), il convient d'évaluer toutes les informations disponibles afin d'établir la nécessité d'effectuer des essais oculaires *in vivo*. Bien que l'évaluation de certains paramètres particuliers puisse livrer des informations capitales (p. ex. un pH extrême), la totalité des informations existantes est prise en considération.

([1]) En ce qui concerne le recours à une stratégie d'essai intégrée pour l'irritation oculaire dans le cadre de REACH, voir également le guide des exigences d'information et évaluation de la sécurité chimique de l'ECHA, Chapitre R.7a:Informations spécifiques aux effets http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

Toutes les données pertinentes sur les effets du produit chimique en question, et de ses analogues structurels, seront examinées en vue d'une prise de décision fondée sur le poids de la preuve, décision qui fait l'objet de justification. Il convient d'accorder le plus de poids aux données humaines et animales existantes, puis aux résultats des essais *in vitro* ou *ex vivo* sur le produit chimique. Les études *in vivo* sur des substances corrosives devront être évitées autant que faire se peut. Les facteurs pris en compte dans la stratégie séquentielle sont repris ci-après:

Évaluation des données humaines et/ou animales existantes et/ou des résultats d'essais *in vitro* obtenus par des méthodes validées et acceptées à l'échelle internationale (Étape 1).

En premier lieu, on examinera les données humaines existantes, notamment les études cliniques et en milieu professionnel ainsi que les rapports de cas, et/ou les résultats d'essais oculaires sur des animaux et/ou les données issues de méthodes d'essai *in vitro* du pouvoir irritant/corrosif sur l'œil validées et acceptées à l'échelle internationale, car ils fournissent des informations directement liées aux effets sur l'œil. On analysera ensuite les données disponibles provenant d'essais de corrosion/irritation cutanées sur les humains et/ou les animaux, et/ou de méthodes d'essai *in vitro* de l'effet corrosif sur la peau validées et acceptées à l'échelle internationale. Les produits chimiques dont le pouvoir corrosif ou fortement irritant pour les yeux est avéré ne sont pas instillés dans les yeux des animaux; pas plus que les produits chimiques corrosifs ou fortement irritants pour la peau, qui seront également considérés comme corrosifs et/ou irritants pour les yeux. Les produits chimiques dont le caractère non corrosif et non irritant a été suffisamment démontré par des études déjà réalisées sur l'œil ne font pas non plus l'objet d'essais oculaires *in vivo*.

Analyse des relations structure-activité (RSA) (Étape 2).

S'ils sont disponibles, les résultats d'essais sur des produits chimiques structurellement proches sont pris en considération. S'il existe des données humaines et/ou animales suffisantes sur des substances structurellement proches ou sur des mélanges de ces substances pour attester leur pouvoir corrosif ou irritant, on peut supposer que le produit chimique étudié provoquera les mêmes réactions. Auquel cas, il n'est plus forcément nécessaire de tester le produit chimique. Les données négatives issues d'études de substances structurellement proches ou de mélanges de ces substances n'offrent pas une preuve suffisante de l'effet non corrosif ou non irritant d'un produit chimique dans le cadre de la stratégie d'essai séquentielle. On déterminera son pouvoir corrosif ou irritant pour la peau et les yeux en appliquant une méthode d'analyse RSA validée et acceptée.

Propriétés physicochimiques et réactivité chimique (Étape 3).

Les produits chimiques présentant des pH extrêmes, à savoir $\leq 2{,}0$ et $\geq 11{,}5$, sont susceptibles d'induire de fortes réactions locales. Si une valeur de pH extrême est un indice de poids quant au caractère corrosif ou irritant d'un produit chimique pour l'œil, sa réserve acide/alcali (pouvoir tampon) est également pris en compte (5) (6) (7). Si le pouvoir tampon suggère que le produit chimique pourrait ne pas être corrosif pour l'œil (produits chimiques présentant un pH extrême et une faible réserve acide/alcaline), d'autres essais seront mis en œuvre pour confirmer cette hypothèse, idéalement un essai *in vitro* ou *ex vivo* validé et accepté (voir paragraphe 10).

Prise en considération des autres informations existantes (Étape 4).

À ce stade, il y a lieu d'évaluer toutes les informations disponibles sur la toxicité systémique par voie cutanée. La toxicité cutanée aiguë du produit chimique d'essai est aussi à prendre en considération. Si l'on a constaté que le produit chimique d'essai est très toxique par voie cutanée, il n'est plus toujours nécessaire de le tester dans l'œil. Bien que la toxicité cutanée aiguë n'implique pas automatiquement un effet irritant ou corrosif sur l'œil, on peut supposer que si un

▼**M7**

produit chimique est fortement toxique par voie cutanée, son instillation dans l'œil déclenchera aussi un effet toxique. Ces données peuvent également être examinées entre la deuxième et la troisième étape

Évaluation du pouvoir corrosif du produit chimique sur la peau, si les dispositions réglementaires l'exigent (Étape 5).

Les éventuels effets corrosifs et fortement irritants sur la peau seront d'abord évalués conformément à la méthode d'essai B.4 (4) et son supplément (8), qui prescrivent le recours à des méthodes d'essai *in vitro* de corrosion cutanée validées et acceptées à l'échelle internationale (9) (10) (11). Si le produit chimique s'avère corrosif ou fortement irritant pour la peau, on pourra également considérer qu'il aura le même effet sur l'œil. Par conséquent, il ne fera pas l'objet d'essais supplémentaires. Si le produit chimique n'est ni corrosif ni fortement irritant pour la peau, il convient de pratiquer un essai *in vitro* ou *ex vivo* sur les yeux.

Résultats des essais *in vitro* ou *ex vivo* (Étape 6).

Les produits chimiques qui se sont révélés corrosifs ou fortement irritants à l'issue d'essais *in vitro* ou *ex vivo* (12) (13) validés et acceptés à l'échelle internationale spécifiquement pour l'évaluation de la corrosion et de l'irritation oculaires n'ont pas besoin d'être testés sur les animaux. Il est très vraisemblable que ces produits chimiques produiront des effets aussi prononcés *in vivo*. S'il ne dispose pas d'un d'essai *in vitro* ou *ex vivo* validé et accepté, l'expérimentateur passera directement à la septième étape.

Essai *in vivo* sur le lapin (Étapes 7 et 8).

L'essai oculaire *in vivo* débute par un essai initial mené sur un seul animal. Si les résultats de cet essai indiquent que le produit chimique exerce un effet corrosif ou fortement irritant sur les yeux, l'expérience s'arrête là. Si cet essai ne fait apparaître aucun effet corrosif ou fortement irritant, un essai de confirmation est pratiqué sur deux animaux supplémentaires. D'autres essais peuvent s'avérer nécessaires en fonction des résultats de l'essai de confirmation. [voir méthode d'essai B.5]

▼M7

PROCÉDURE D'ESSAI ET D'ÉVALUATION DE L'IRRITATION ET DE LA CORROSION OCULAIRES

	Activité	Résultat	Conclusion
1	Examiner les données humaines et/ou animales existantes, et/ou les données *in vitro* obtenues par des méthodes validées et acceptées à l'échelle internationale montrant des effets sur les yeux	Lésions oculaires sévères	Critère décisif; produit chimique considéré comme corrosif pour l'œil. Aucun essai nécessaire.
		Effet irritant pour l'œil	Critère décisif; produit chimique considéré comme irritant pour l'œil. Aucun essai nécessaire.
		Effet ni corrosif ni irritant pour l'œil	Critère décisif; produit chimique considéré comme non corrosif et non irritant pour l'œil. Aucun essai nécessaire.
	Examiner les données humaines et/ou animales existantes et/ou les données *in vitro* obtenues par des méthodes validées et acceptées à l'échelle internationale montrant des effets corrosifs pour la peau	Effet corrosif pour la peau	Produit chimique supposé corrosif pour l'œil. Aucun essai nécessaire.
	Examiner les données humaines et/ou animales existantes et/ou les données *in vitro* obtenues par des méthodes validées et acceptées à l'échelle internationale montrant des effets fortement irritants pour la peau	Effet fortement irritant pour la peau	Produit chimique supposé irritant pour l'œil. Aucun essai nécessaire
	↓		
	Pas d'information disponible ou informations non concluantes		
	↓		
2	Procéder à une analyse RSA pour la corrosion et l'irritation oculaires	Lésions oculaires sévères prévisibles	Produit chimique supposé corrosif pour l'œil. Aucun essai nécessaire.
		Irritation oculaire prévisible	Produit chimique supposé irritant pour l'œil. Aucun essai nécessaire.
	Envisager une analyse RSA pour la corrosion cutanée	Corrosion cutanée prévisible	Produit chimique supposé corrosif pour l'œil. Aucun essai nécessaire.
	↓		
	Effet impossible à prédire ou prédiction incertaine ou négative		
	↓		
3	Mesurer le pH (et le pouvoir tampon, le cas échéant)	pH ≤ 2 ou ≥ 11,5 (avec un pouvoir tampon élevé, le cas échéant)	Produit chimique supposé corrosif pour l'œil. Aucun essai nécessaire.
	↓		
	2 < pH < 11,5, ou pH ≤ 2,0 ou ≥ 11,5 avec pouvoir tampon faible ou nul, le cas échéant		
	↓		
4	Examiner les données existantes sur la toxicité systémique par voie cutanée	Toxicité aiguë aux concentrations utilisées dans l'essai oculaire.	Le produit chimique sera trop toxique pour être testé. Aucun essai nécessaire.

▼M7

	Activité	Résultat	Conclusion
	↓		
	Informations non disponibles, ou le produit chimique n'est pas très toxique		
	↓		
5	Procéder à un essai de corrosion cutanée conforme à la démarche expérimentale indiquée dans le chapitre B.4 de la présente annexe si la réglementation l'exige également	Effet corrosif ou fortement irritant	Produit chimique supposé corrosif pour l'œil. Aucun essai supplémentaire nécessaire.
	↓		
	Produit chimique ni corrosif ni fortement irritant pour la peau		
	↓		
6	Procéder à un ou plusieurs essais oculaires *in vitro* ou *ex vivo* validés et acceptés	Effet corrosif ou fortement irritant	Produit chimique supposé corrosif ou fortement irritant pour l'œil, à condition que l'essai effectué détecte les produits chimiques corrosifs et fortement irritants et que le produit chimique d'essai entre dans son domaine d'applicabilité. Aucun essai supplémentaire nécessaire.
		Effet irritant	Produit chimique supposé irritant pour l'œil, à condition que le ou les essais effectués détectent correctement les produits chimiques corrosifs, irritants et fortement irritants et que le produit chimique d'essai entre dans leur domaine d'applicabilité. Aucun essai supplémentaire nécessaire.
		Pas d'effet irritant	Produit chimique supposé non irritant pour l'œil, à condition que le ou les essais effectués détectent correctement les produits chimiques non irritants, les distinguent efficacement des produits chimiques corrosifs, irritants et fortement irritants pour l'œil, et que le produit chimique d'essai entre dans leur domaine d'applicabilité. Aucun essai supplémentaire nécessaire.
	↓		
	Le ou les essais oculaires in vitro ou ex vivo *validés et acceptés ne permettent pas de conclure*		
	↓		

▼M7

	Activité	Résultat	Conclusion
7	Procéder sur un seul animal à un essai initial *in vivo* sur œil de lapin	Lésions oculaires sévères	Produit chimique considéré comme corrosif pour l'œil. Aucun essai supplémentaire nécessaire.
	↓		
	Pas de lésions sévères, ou aucun effet		
	↓		
8	Procéder à un essai de confirmation sur un ou deux animaux supplémentaires	Effet corrosif ou irritant	Produit chimique considéré comme corrosif ou irritant pour l'œil. Aucun essai supplémentaire nécessaire.
		Effet ni corrosif ni irritant	Produit chimique considéré comme non irritant et non corrosif pour l'œil. Aucun essai supplémentaire nécessaire.

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (1996), OECD Test Guidelines Programme: *Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods*, Atelier organisé à Solna (Suède) les 22 — 24 janvier 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) OCDE (1998), *Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances*, adopté par la 28e Réunion conjointe du Comité des produits chimiques et du Groupe de travail sur les produits chimiques, novembre 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P. et Fentem J.H. (1999), A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies,. ATLA 27, 161-177.

(4) Chapitre B.4 de la présente annexe, Toxicité aiguë: irritation/corrosion cutanée.

(5) Young, J.R. et autres (1988), Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals, Toxicol. *In Vitro*, 2, 19 — 26.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, pp.483 — 524.

(7) Neun, D.J. (1993), Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. *Cut. Ocular Toxicol*. 12, 227 — 231.

(8) Supplément au chapitre B.4 de la présente annexe, Démarche expérimentale séquentielle pour les essais d'irritation et de corrosion cutanées.

(9) Chapitre B.40 de la présente annexe, *Corrosion cutanée in vitro*: *Essai de résistance électrique transcutanée (RET).*

(10) Chapitre B.40bis de la présente annexe, *Corrosion cutanée in vitro*: *Essai sur modèle de peau humaine.*

(11) OCDE (2006), *Essai no 435: Méthode d'essai in vitro sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, OCDE Paris.

▼**M7**

(12) Chapitre B.47 de la présente annexe, Méthode d'essai d'opacité et de perméabilité de la cornée bovine pour l'identification i) des produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves et ii) des produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave

(13) Chapitre B.48 de la présente annexe, Méthode d'essai sur œil de poulet isolé pour l'identification i) des produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves et ii) des produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave.

▼B

B.6. SENSIBILISATION CUTANÉE

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

Remarques

La sensibilité des essais et leur capacité à détecter les substances susceptibles d'entraîner une sensibilisation cutanée chez l'homme sont des critères importants dans un système de classification de la toxicité établi à des fins de santé publique.

Il n'existe pas de méthode d'essai unique qui permette d'identifier de manière adéquate toutes les substances ayant un potentiel de sensibilisation cutanée pour l'homme et qui puisse être appliquée à toutes les substances.

Divers facteurs tels que les caractéristiques physiques d'une substance, y compris son pouvoir de pénétration cutanée, doivent être pris en considération lors du choix de l'essai.

Deux types d'essai utilisant des cobayes ont été développés: d'une part, les essais avec adjuvant dans lesquels l'état est potentialisé par la dissolution ou la mise en suspension dans de l'adjuvant complet de Freund (ACF) de la substance à tester, et d'autre part les essais sans adjuvant.

Les essais avec adjuvant ont généralement un meilleur pouvoir prédictif du potentiel sensibilisant cutanée de la substance testée avec plus de précision que les méthodes qui n'utilisent pas l'adjuvant complet de Freund. C'est la raison pour laquelle leur utilisation est préférable.

L'essai de maximalisation chez le cobaye (GPMT: Guinea Pig Maximisation Test) est un essai avec adjuvant très répandu. Bien qu'il existe plusieurs autres méthodes pour détecter le potentiel de sensibilisation cutanée, le GPMT est l'essai avec adjuvant de prédilection.

Les essais sans adjuvant (l'essai de Buehler étant préférable) sont considérés comme moins sensibles vis-à-vis de nombreuses classes de produits chimiques.

Dans certains cas, l'essai de Buehler qui consiste en une application topique, peut s'avérer préférable à l'essai de maximalisation qui nécessite une injection intradermique. L'utilisation de l'essai de Buehler doit être scientifiquement justifiée.

L'essai de maximalisation chez le cobaye (GMPT) et l'essai de Buehler sont décrits dans cette méthode. D'autres méthodes peuvent être utilisées, à condition qu'elles soient correctement validées et que leur utilisation soit scientifiquement justifiée.

Si un résultat positif est obtenu dans un test de dépistage reconnu, une substance peut être considérée comme un sensibilisant potentiel et il peut ne pas être nécessaire de réaliser un essai complémentaire sur le cobaye. Cependant si un résultat négatif est obtenu dans un tel test de dépistage, un essai sur le cobaye doit être effectué en utilisant la procédure décrite dans la présente méthode d'essai.

Voir également introduction générale, partie B.

▼B

1.2. DÉFINITIONS

La sensibilisation cutanée (dermite allergique de contact) est une réaction immunologique cutanée à une substance. Chez l'homme, la réaction peut se caractériser par un prurit, un érythème, un œdème, des vésicules, des bulles ou une association de ces manifestations. Dans les autres espèces, la réaction peut différer et prendre uniquement la forme d'un érythème ou d'un œdème.

Exposition d'induction: exposition expérimentale d'un sujet à une substance dans le but d'induire une hypersensibilité.

Période d'induction: période d'au moins une semaine consécutive à l'exposition d'induction, au cours de laquelle une hypersensibilité peut s'installer.

Exposition de déclenchement: exposition expérimentale, après période d'induction, d'un sujet préalablement exposé à la substance, dans le but de vérifier si le sujet présente une réaction d'hypersensibilité.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

La sensibilité et la fiabilité de la technique expérimentale utilisée doivent être vérifiées tous les six mois à l'aide de substances ayant des propriétés connues de sensibilisation cutanée faible à modérée.

Pour un essai conduit selon les règles, les substances faiblement ou moyennement sensibilisantes provoquent normalement une réaction d'au moins 30 % dans les méthodes avec adjuvant et 15 % dans les méthodes sans adjuvant.

Les substances suivantes seront de préférence utilisées:

Numéro CAS	Numéro EINECS	Dénomination EINECS	Dénomination usuelle
101-86-0	202-983-3	α-hexylcinnamaldéhyde	α-hexylcinnamaldéhyde
149-30-4	205-736-8	benzothiazole-2-thiol (mercapto-benzothiazole)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzocaïne	nordcaïne

Dans certaines circonstances dûment justifiées, il est possible d'utiliser d'autres substances répondant aux critères ci-dessus.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Les animaux d'expérience sont dans un premier temps exposés à la substance à tester par une injection intradermique et/ou une application épidermique (exposition d'induction). Après une période de repos de 10 à 14 jours (période d'induction) au cours de laquelle une réaction immunitaire peut se produire, les animaux sont exposés à une dose de déclenchement. L'étendue et le degré de la réaction cutanée des animaux sont alors comparées à celles de la réaction observée chez les animaux témoins qui ont reçu un placebo lors de 1 induction et qui ont été soumis à l'exposition de déclenchement.

1.5. DESCRIPTION DES MÉTHODES D'ESSAI

Si l'élimination de la substance à tester s'avère nécessaire, ceci doit être fait en utilisant de l'eau ou un solvant approprié afin de ne pas modifier la réaction existante ou l'intégrité de l'épiderme.

▼B

1.5.1. *Essai de maximalisation chez le cobaye (GMPT)*

1.5.1.1. Préparation

De jeunes cobayes albinos, sains, sont acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins cinq jours avant le début de l'essai. Avant l'essai, les animaux sont répartis au hasard en lots à traiter et lots témoins. Les poils sont tondus, rasés ou épilés chimiquement selon la méthode utilisée. Il faut veiller à ne pas érafler la peau. Les animaux sont pesés avant le début et à la fin de l'essai.

1.5.1.2. Conditions de l'essai

1.5.1.2.1. Animaux d'expérience

Souches de cobayes albinos couramment utilisées en laboratoire.

1.5.1.2.2. Nombre et sexe

On peut utiliser des animaux de l'un ou l'autre sexe. Si l'on utilise des femelles, elles doivent être nullipares et non gravides.

Le lot traité comprend au minimum 10 animaux et le lot témoin, au moins 5. Si le lot traité comprend moins de 20 animaux et le lot témoin moins de 10, et qu'il n'est pas possible de conclure que la substance à tester est un agent sensibilisant. Dans ce cas, il est fortement recommandé d'utiliser d'autres animaux afin d'arriver à un total d'au moins 20 animaux d'essai et 10 animaux témoins.

1.5.1.2.3. Doses

La concentration de substance utilisée pour chaque exposition d'induction doit être bien tolérée par l'organisme des animaux et doit correspondre à la concentration maximale entraînant une irritation cutanée légère à modérée. La concentration utilisée pour l'exposition de déclenchement doit correspondre à la concentration maximale n'entraînant pas d'irritation. Si nécessaire, les concentrations appropriées peuvent être déterminées à partir d'un essai pilote impliquant deux ou trois animaux. À cet effet, il convient d'utiliser des animaux traités par l'adjuvant complet de Freund.

1.5.1.3. Mode opératoire

1.5.1.3.1. Induction

Jour 0 — lot traité

Trois séries de deux injections intradermiques d'un volume de 0,1 ml chacune sont pratiquées dans la région scapulaire préalablement débarrassée de ses poils, de part et d'autre de la ligne médiane.

Injection 1: mélange 1:1 (v/v) adjuvant complet de Freund/eau ou sérum physiologique

Injection 2: la substance à tester dans un véhicule adéquat, à la concentration sélectionnée

Injection 3: la substance à tester à la concentration voulue, mélangée dans un rapport 1:1 (v/v) à de l'adjuvant complet de Freund ou du sérum physiologique.

Pour l'injection 3, les substances hydrosolubles sont dissoutes dans la phase aqueuse avant d'être mélangées avec l'adjuvant complet de Freund. Les substances liposolubles ou insolubles sont d'abord mises en suspension dans 1 adjuvant complet de Freund, puis mises en phase aqueuse. La concentration finale de la substance à tester doit être égale à celle utilisée pour l'injection 2.

▼B

Les injections 1 et 2 sont pratiquées à proximité l'une de l'autre et le plus près possible de la tête, tandis que l'injection 3 est effectuée vers la partie caudale de la zone d'essai.

Jour 0 — lot témoin

Trois séries de deux injections intradermiques d'un volume de 0,1 ml chacune sont réalisées aux mêmes endroits que chez les animaux traités.

Injection 1: mélange 1:1 (v/v) adjuvant complet de Freund/eau ou sérum physiologique

Injection 2: le véhicule non dilué

Injection 3: formulation à 50 % du véhicule dans un mélange 1:1 d'adjuvant complet de Freund/eau ou sérum physiologique.

5e — 7e jour — lot traité et lot témoin

Environ 24 heures avant l'application topique d'induction et si la substance ne provoque pas d'irritation cutanée, la zone d'essai rasée et/ou tondue est badigeonnée avec 0,5 ml de lauryl sulfate de sodium à 10 % dans de la vaseline, afin de créer une irritation locale.

6e — 8e jour — lot traité

La zone d'essai est à nouveau débarrassée de ses poils. Un papier filtre (2 x 4 cm) imprégné de la substance dans le véhicule approprié est appliqué sur la zone d'essai et maintenu en contact avec la peau à l'aide d'un pansement occlusif pendant 48 heures. Le choix du véhicule doit être justifié. Les substances solides sont réduites en poudre fine et incorporées dans un véhicule approprié; les substances liquides peuvent éventuellement être appliquées directement.

6e — 8e jour — lot témoin

La zone d'essai est à nouveau débarrassée de ses poils. Le véhicule seul est appliqué comme indiqué précédemment sur la zone d'essai et maintenu en contact avec la peau pendant 48 heures à l'aide d'un pansement occlusif.

1.5.1.3.2. Déclenchement

20e — 22ème jour — lot traité et lot témoin

Les flancs des animaux traités et des animaux témoins sont débarrassés de leurs poils. Un patch ou une cupule chargés de la substance à tester est appliquée sur un des flancs des animaux et, s'il y a lieu, un patch ou une cupule imprégnés uniquement du véhicule est appliquée sur l'autre flanc. Les pastilles sont maintenues en contact avec la peau pendant 24 heures à l'aide d'un pansement occlusif.

1.5.1.3.3. Observation et cotation: lot traité et lot témoin

— Environ 21 heures après le retrait de la pastille, la zone étudiée est nettoyée et rasée et/ou tondue et épilée si nécessaire;

— 3 heures plus tard environ (à peu près 48 heures après le début de l'application de déclenchement), la réaction cutanée est observée et cotée d'après l'échelle indiquée en annexe;

— environ 24 heures après cette observation, on procède à une seconde observation (72 heures) et à une nouvelle cotation.

Il est recommandé de procéder à une lecture en aveugle chez les animaux traités et les animaux témoins.

S'il est nécessaire de préciser les résultats obtenus lors de la première exposition de déclenchement, une seconde exposition de déclenchement (c'est-à-dire redéclenchement), si nécessaire avec un nouveau lot témoin, sera envisagée environ une semaine après la première exposition. La nouvelle exposition de déclenchement peut également être effectuée sur le lot témoin initial.

▼B

Toutes les réactions cutanées et toutes les observations inhabituelles, y compris les réactions systémiques, résultant d'une exposition d'induction ou de déclenchement, doivent être observées et cotées d'après l'échelle de Magnusson/Kligman (voir annexe). D'autres techniques telles qu'un examen histopathologique ou la mesure de l'épaisseur du pli cutané peuvent être utilisées pour préciser les réactions douteuses.

1.5.2. *Essai de Buehler*

1.5.2.1. Préparation

De jeunes cobayes albinos, sains, sont acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins cinq jours avant le début de l'essai. Avant l'essai, les animaux sont répartis au hasard en lots à traiter et lots témoins. Les poils sont coupés, rasés ou éventuellement épilés chimiquement selon la méthode utilisée. Il faut veiller à ne pas érafler la peau. Les animaux sont pesés avant le début et à la fin de l'essai.

1.5.2.2. Conditions de l'essai

1.5.2.2.1. Animaux d'expérience

Souches de cobayes albinos couramment utilisées en laboratoire.

1.5.2.2.2. Nombre et sexe

On peut utiliser des animaux de l'un ou l'autre sexe. Si l'on utilise des femelles, elles doivent être nullipares et non gravides.

Le lot traité comprend au minimum 20 animaux et le lot témoin, au moins 10.

1.5.2.2.3. Doses

Pour chaque exposition d'induction, la concentration de substance à utiliser est la concentration maximale entraînant une irritation modérée mais non excessive. Pour l'exposition de déclenchement, la concentration à utiliser est la concentration maximale n'entraînant pas d'irritation. Si nécessaire, les concentrations appropriées peuvent être déterminées à partir d'un essai pilote impliquant deux ou trois animaux.

Pour les substances hydrosolubles, il convient d'utiliser comme véhicule de l'eau ou une solution diluée non irritante de surfactant. Pour les autres substances, il est préférable d'utiliser un mélange d'éthanol à 80 % dans de l'eau pour l'induction, et de l'acétone pour le déclenchement.

1.5.2.3. Mode opératoire

1.5.2.3.1. Induction

Jour 0 — lot traité

Un des flancs des animaux est rasé. La compresse servant à réaliser le test est imprégnée de la substance à tester incorporée dans un véhicule approprié (le choix du véhicule doit être justifié; les substances liquides peuvent au besoin être appliquées directement). La compresse est appliquée sur la zone d'essai et maintenue en contact avec la peau pendant 6 heures à l'aide d'un pansement occlusif ou d'une cupule et d'un pansement approprié.

▼B

Le système doit être occlusif. Un tampon de ouate rond ou carré de 4 à 6 cm^2 convient. Il est préférable d'utiliser un dispositif de contention approprié pour garantir l'occlusion. Si l'on utilise des bandages, des expositions supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires.

Jour 0 — lot témoin

Un des flancs des animaux est rasé. Le véhicule seul est appliqué de la façon décrite pour les animaux traités. La compresse servant à réaliser le test est maintenue en contact avec la peau pendant 6 heures à l'aide d'un pansement occlusif ou d'une cupule et d'un pansement approprié. S'il peut être prouvé qu'il n'est pas nécessaire de simuler le traitement sur le lot témoin, cette étape peut être omise, un contrôle ne recevant rien peut être utilisé.

6^e — 8^e jour et 13^e — 15^e jour — lot traité et lot témoin

La même application que celle décrite au jour 0 est réalisée sur la même zone (débarrassée de ses poils si nécessaire) du même flanc au 6^e — 8^e jour, puis à nouveau au 13^e — 15^e jour.

1.5.2.3.2. Déclenchement

27^e — 29^e jour — lot traité et lot témoin

Le flanc non traité des animaux du lot traité et du lot témoin est rasé. Une compresse occlusive ou une cupule contenant la quantité appropriée de la substance à tester, à la concentration maximale n'entraînant pas d'irritation, est appliquée sur la partie postérieure du flanc non traité des animaux du lot traité et du lot témoin.

S'il y a lieu, on appliquera également une compresse occlusive ou une cupule ne contenant que le véhicule sur la partie antérieure du flanc non traité des animaux du lot traité et du lot témoin. Les compresses ou cupules sont maintenues en contact avec la peau à l'aide d'un pansement approprié pendant 6 heures.

1.5.2.3.3. Observations et cotation

— Environ 21 heures après le retrait de la compresse, la zone d'essai est débarrassée de ses poils;

— environ trois heures plus tard (à peu près 30 heures après le début de l'exposition de déclenchement), la réaction cutanée est observée et cotée d'après l'échelle indiquée en annexe;

— environ 24 heures après cette observation (soit environ 54 heures après l'exposition de déclenchement), la réaction cutanée est à nouveau observée et cotée.

Il est recommandé d'effectuer une lecture en aveugle de la réaction dans le lot traité et le lot témoin.

S'il est nécessaire de préciser les résultats obtenus lors de la première exposition de déclenchement, une seconde exposition de déclenchement, si nécessaire avec un nouveau lot témoin, sera envisagée environ une semaine après la première exposition. La nouvelle exposition de déclenchement peut également être effectuée sur le lot témoin initial.

▼B

Toutes les réactions cutanées et toutes les observations inhabituelles, y compris les réactions systémiques, résultant d'une exposition d'induction ou de déclenchement (c'est-à-dire de redéclenchement), doivent être consignées et cotées d'après l'échelle de Magnusson/Kligman (voir annexe). D'autres techniques telles qu'un examen histopathologique ou la mesure de l'épaisseur du pli cutané peuvent être utilisées pour préciser les réactions douteuses.

2. **RÉSULTATS (GMPT ET ESSAI DE BUEHLER)**

Les résultats sont récapitulés sous forme de tableaux indiquant, pour chaque animal, la réaction cutanée lors de chaque observation.

3. **COMPTE RENDU (GMPT ET ESSAI DE BUEHLER)**

Lorsqu'un test de dépistage [par exemple essai local sur ganglions lymphatiques (LLNA), essai de gonflement de l'oreille de souris (MEST)], est effectué préalablement à l'essai sur le cobaye, il convient d'en fournir la description ou la référence, ainsi que les détails du mode opératoire et les résultats obtenus avec la substance à tester et les substances de référence.

Procès-verbal d'essai (GMPT et essai de Buehler)

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience:

— souche de cobayes utilisée,

— nombre, âge et sexe des animaux,

— origine, conditions d'hébergement, régime alimentaire, etc.,

— poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions expérimentales:

— technique de préparation du site d'application,

— détails sur les matériaux utilisés pour l'application et la technique d'application,

— résultats de l'étude pilote et conclusions concernant les concentrations d'induction et de déclenchement à utiliser dans l'essai,

— détails concernant la préparation, l'application et l'élimination de la substance à tester,

— justification du choix du véhicule,

— concentrations du véhicule et de la substance à tester utilisées pour les expositions d'induction et de déclenchement, et quantité totale de substance appliquée pour l'induction et le déclenchement.

Résultats:

— résumé des résultats du dernier contrôle de sensibilité et de fiabilité (voir 1.3), y compris informations sur la substance, la concentration et le véhicule utilisés,

▼B

— toute observation effectuée sur chaque animal, cotations comprises,

— description de la nature et de la gravité des effets observés,

— toute observation histopathologique.

Discussion des résultats

Conclusions

4. **RÉFÉRENCES**

Cette méthode reprend la ligne directrice 406 de l'OCDE.

▼B

Appendice

TABLEAU

échelle de Magnusson et Kligman pour la cotation des réactions cutanées à une exposition de déclenchement

0 = pas de modification apparente

1 = érythème discret ou localisé

2 = érythème modéré et confluent

3 = érythème intense avec gonflement

▼M4

B.7. ÉTUDE DE TOXICITÉ ORALE À DOSE RÉPÉTÉE PENDANT 28 JOURS SUR LES RONGEURS

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 407 (2008) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La ligne directrice 407 originale avait été adoptée en 1981. Des modifications y ont été apportées en 1995 afin de tirer davantage d'informations des animaux utilisés dans l'étude, en particulier en matière de neurotoxicité et d'immunotoxicité.

2. L'OCDE a lancé en 1998 une activité prioritaire destinée à réviser les lignes directrices existantes et à en élaborer de nouvelles pour les essais et le dépistage des perturbateurs endocriniens (8). L'un des objectifs était de mettre à jour la ligne directrice de l'OCDE relative à l'«étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs» (407), en y introduisant des paramètres capables de détecter l'activité endocrinienne des substances d'essai. Le protocole a alors fait l'objet d'un programme international approfondi chargé d'évaluer la pertinence et la praticabilité de ces paramètres additionnels, leur performance pour des produits chimiques à activité (anti)œstrogénique, (anti)androgénique et (anti)thyroïdienne, leur reproductibilité intra- et inter-laboratoires et leur interférence avec les paramètres requis par la version antérieure de la ligne directrice. Les très nombreuses données ainsi recueillies ont été rassemblées et évaluées en détail dans un rapport très complet de l'OCDE (9). La présente mise à jour de la méthode B.7 est le fruit de l'expérience et des résultats accumulés durant le programme international d'essais. Elle permet de mettre certains effets à médiation endocrinienne en perspective avec d'autres effets toxicologiques.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITATIVES

3. Lors de l'appréciation et de l'évaluation des caractéristiques toxiques d'un produit chimique, la détermination de la toxicité orale à doses répétées peut s'effectuer après avoir obtenu des informations préliminaires sur la toxicité à partir d'essais de toxicité aiguë. La présente méthode d'essai vise à étudier les effets toxiques des produits chimiques sur un large spectre de cibles de toxicité. Elle fournit des informations sur les risques pour la santé que peut entraîner une exposition répétée durant une période de temps relativement limitée, notamment pour le système nerveux, le système immunitaire et le système endocrinien. Concernant ces critères d'effet précis, elle devrait permettre d'identifier des produits chimiques potentiellement neurotoxiques, pouvant justifier des études plus approfondies de cet aspect, etdes produits chimiques qui interfèrent avec la physiologie de la thyroïde. Elle pourrait également fournir des données sur les produits chimiques qui affectent les organes reproducteurs mâles et/ou femelles des jeunes animaux adultes et donner des indications sur leurs effets immunologiques.

4. Les résultats de la présente méthode d'essai B.7 devraient servir à l'identification des dangers et à l'évaluation des risques. Les résultats obtenus concernant les paramètres endocriniens devraient être interprétés à la lumière du «Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des produits chimiques perturbant le système endocrinien» (11). La méthode prévoit une étude basique de toxicité à dose répétée, pouvant être utilisée sur les produits chimiques pour lesquels une étude de 90 jours n'est pas justifiée (par exemple quand le volume de production ne dépasse pas certaines limites) ou préalablement à une étude à long terme. La durée d'exposition doit être de 28 jours.

▼**M4**

5. Le programme international mené afin de valider les paramètres susceptibles de détecter l'activité endocrinienne d'une substance d'essai a montré que la qualité des données obtenues grâce à cette méthode d'essai B.7 dépendra beaucoup de l'expérience du laboratoire pratiquant les essais. Ce constat concerne spécifiquement la détermination histopathologique de changements cycliques dans les organes reproducteurs femelles et la détermination du poids des petits organes hormono-dépendants, difficiles à disséquer. Un document d'orientation a été élaboré en matière d'histopathologie (19). Il est disponible sur le site de l'OCDE à la rubrique consacrée aux lignes directrices pour les essais de produits chimiques. Il vise à aider les pathologistes dans leurs investigations et à améliorer la sensibilité des essais. Un certain nombre de paramètres ont été identifiés comme indicateurs de toxicité endocrinienne et ont été ajoutés à la méthode d'essai. D'autres, dont l'utilité n'a pu être prouvée faute de données suffisantes ou dont la capacité à détecter les perturbateurs endocriniens a été insuffisamment démontrée par le programme de validation, sont proposés comme paramètres facultatifs (voir appendice 2).

6. Sur la base des données produites par le processus de validation, il convient de souligner que la sensibilité de cet essai est insuffisante pour identifier toutes les substances présentant une action (anti)androgénique ou (anti)œstrogénique (9). La présente méhtode d'essai ne s'applique pas à un stade de vie très sensible aux perturbations endocriniennes. Elle a pourtant permis, pendant le processus de validation, d'identifier des substances affectant faiblement ou fortement la fonction thyroïdienne, ainsi que des substances agissant fortement ou modérément sur le système endocrinien par le biais des récepteurs aux œstrogènes et aux androgènes, mais dans la plupart des cas, n'est pas parvenue à identifier les substances agissant sur le système endocrinien en affectant faiblement ces récepteurs. Ainsi ne peut-elle être décrite comme un essai de dépistage de l'activité endocrinienne.

7. Par conséquent, l'absence d'effet lié à ces modes d'action ne peut constituer une preuve de l'absence d'effet sur le système endocrinien. En ce qui concerne les effets à médiation endocrinienne, la caractérisation des substances ne doit donc pas s'appuyer uniquement sur les résultats de la présente méthode d'essai, mais doit être utilisée dans le cadre d'une démarche fondée sur le «poids de la preuve», combinant toutes les données existant sur un produit chimique pour caractériser son action potentielle sur le système endocrinien. C'est pourquoi la prise de décision réglementaire sur l'activité endocrinienne des produits chimiques (caractérisation des substances) doit adopter une méthode large ne s'appuyant pas sur les résultats de cette seule méthode d'essai.

8. Il est entendu que toutes les procédures d'essai utilisant des animaux obéiront aux normes locales en vigueur sur le traitement à leur réserver; la description des soins et traitements prodigués aux animaux utilisés dans le présent essai correspond donc à des normes de performance minimales qui seront le cas échéant adaptées à la législation locale si celle-ci est plus stricte. D'autres recommandations sur l'humanité du traitement à réserver aux animaux ont été formulées par l'OCDE (14).

9. L'appendice 1 présente les définitions utilisées.

PRINCIPE DE L'ESSAI

10. La substance à tester est administrée quotidiennement par voie orale à différents niveaux de dose à plusieurs groupes d'animaux, à raison d'un niveau de dose par groupe, pendant une période de 28 jours. Chaque jour au cours de cette période, les animaux sont examinés soigneusement afin de déceler tout signe de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont euthanasiés au cours de l'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont également euthanasiés et autopsiés. Une étude de 28 jours fournit des informations sur les effets d'une exposition répétée par voix

▼M4

orale et peut indiquer la nécessité d'études ultérieures plus longues. Elle peut également apporter des informations sur la sélection des concentrations en vue d'études plus poussées. Les données tirées de l'application de la méthode d'essai devraient permettre de caractériser la toxicité de la substance d'essai, d'avoir une indication sur la relation dose réponse et de déterminer la concentration sans effet nocif observé (CSENO).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Sélection de l'espèce animale

11. L'espèce de rongeur préférée est le rat, bien que d'autres espèces de rongeurs puissent être utilisées. Si les paramètres spécifiés dans la méthode d'essai B.7 sont étudiés sur une autre espèce de rongeur, une justification détaillée devra être donnée. Bien qu'il soit biologiquement plausible que d'autres espèces répondent aux produits toxiques de manière similaire au rat, l'utilisation d'espèces plus petites peut provoquer une variabilité accrue compte tenu de la difficulté technique à disséquer des organes de plus petite taille. Le rat a été la seule espèce utilisée lors du programme international de validation des paramètres pour la détection des perturbateurs endocriniens. Il convient d'employer de jeunes animaux adultes sains issus de souches de laboratoire courantes. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. L'administration doit commencer dès que possible après le sevrage et, dans tous les cas, avant l'âge de neuf semaines. Au début de l'étude, les différences de poids entre les animaux utilisés doivent être minimales et ne pas excéder ± 20 % de la moyenne du poids pour chaque sexe. Lorsque l'essai est conduit à titre d'étude préliminaire à une étude de toxicité à long terme, il est préférable d'utiliser des animaux issus de la même souche et de la même source dans les deux études.

Encagement et alimentation

12. Toutes les procédures doivent respecter les normes locales en vigueur sur le traitement des animaux de laboratoire. La température dans le local d'expérimentation doit être de 22 °C (± 3 °C). L'humidité relative doit être d'au moins 30 % et si possible ne pas dépasser 70 %, excepté pendant le nettoyage de la pièce, l'idéal étant 50-60 %. Pour l'éclairage, on doit utiliser la lumière artificielle et respecter une séquence de 12 heures d'éclairement et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire peut être un régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété. Le choix du régime alimentaire peut être influencé par la nécessité d'assurer un mélange convenable de la substance d'essai, lorsqu'elle est administrée dans la nourriture. Les animaux doivent être encagés par petits groupes du même sexe; ils peuvent être encagés individuellement si une nécessité scientifique le justifie. Pour l'encagement de groupe, il convient de ne pas dépasser cinq animaux par cage.

13. La nourriture doit être analysée régulièrement à la recherche de contaminants. Un échantillon en sera conservé jusqu'à la finalisation du rapport.

Préparation des animaux

14. De jeunes animaux adultes sains sont répartis au hasard entre le groupe témoin et les groupes traités. Les cages doivent être placées de façon à réduire au minimum l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats. Les animaux sont identifiés individuellement et placés dans les cages au moins cinq jours avant le début de l'étude, pour leur permettre de s'acclimater aux conditions du laboratoire.

Préparation des doses

15. La substance d'essai est administrée par gavage ou dans la nourriture ou l'eau de boisson, la méthode étant choisie en fonction de l'objectif de l'étude et des propriétés physico-chimiques, toxiques et cinétiques de la substance d'essai.

▼M4

16. Lorsque cela s'avère nécessaire, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule adéquat. On recommande, de privilégier, dans la mesure du possible, l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse. À défaut, on peut utiliser une solution ou une suspension dans l'huile (par exemple l'huile de maïs) et finalement une solution dans d'autres véhicules. La toxicité des véhicules autres que l'eau doit être connue. La stabilité de la substance d'essai dans le véhicule doit être déterminée.

PROTOCOLE

Nombre et sexe des animaux

17. Au moins 10 animaux (5 femelles et 5 mâles) doivent être utilisés pour chaque dose. Si on envisage d'euthanasier des animaux au cours de l'essai, il faut accroître le nombre d'animaux d'expérience du nombre d'animaux euthanasiés avant la fin de l'épreuve. On envisagera d'inclure un groupe satellite supplémentaire de 10 animaux (5 par sexe) dans le groupe témoin et dans le groupe traité à la plus forte dose, afin d'observer la réversibilité, la persistance, ou l'apparition tardive des effets toxiques, au moins 14 jours après le traitement.

Dosage

18. De manière générale, au moins trois groupes d'essai et un groupe témoin doivent être utilisés, mais si d'après l'évaluation des autres données aucun effet n'est attendu à la dose de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, un essai limite peut être réalisé. S'il n'existe aucune donnée préalable, une étude préliminaire (animaux de la même souche et de la même provenance) peut être menée pour faciliter la détermination des doses à utiliser. Exception faite de l'exposition avec la substance à tester, les animaux du groupe témoin doivent être traités d'une manière identique à ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé pour administrer la substance d'essai, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé.

19. Les niveaux de dose doivent être déterminés en tenant compte de toutes les informations disponibles concernant les propriétés toxiques ou toxico-cinétiques de la substance d'essai ou de substances analogues. La dose la plus élevée doit provoquer des effets toxiques, sans être létale ou causer de sévères souffrances. Une séquence de doses décroissantes doit ensuite être sélectionnée en vue de mettre en évidence tout effet lié à la dose ainsi qu'une concentration sans effet nocif observé (CSENO) à la dose la plus faible. Des intervalles correspondant à un facteur 2 ou 4 sont souvent les plus appropriés entre les doses décroissantes et l'inclusion d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation de très grands intervalles (par exemple un facteur supérieur à 10) entre les doses.

20. En cas d'observation d'une toxicité générale (par exemple réduction du poids corporel, effets sur le foie, le cœur, les poumons ou les reins, etc.) ou d'autres modifications susceptibles de ne pas constituer une réponse toxique (par exemple diminution de la prise de nourriture, grossissement du foie), les effets observés sur les paramètres neurologiques, endocriniens ou liés au système immunitaire, devront être interprétés avec précaution.

Essai limite

21. Si un essai pratiqué avec une seule dose d'au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, ou, pour une administration par le biais de la nourriture ou de l'eau, d'un pourcentage équivalent de cette nourriture ou de cette eau (en fonction de la détermination du poids corporel), en suivant le mode opératoire décrit pour cette étude, ne produit aucun effet toxique observable et s'il n'y a pas de raison de penser que la substance soit toxique compte tenu des données dont on dispose au sujet de substances ayant une structure analogue, on peut considérer qu'il n'est pas nécessaire de réaliser une étude complète avec trois niveaux de dose. L'essai limite s'applique, sauf lorsque les données d'exposition humaine indiquent la nécessité d'utiliser une dose plus élevée.

▼M4

Administration des doses

22. La substance d'essai est administrée aux animaux quotidiennement, sept jours sur sept, sur une période de 28 jours. Lorsque la substance d'essai est administrée par gavage, les animaux doivent recevoir une dose unique, introduite au moyen d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal d'expérience. Ce volume ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas des solutions aqueuses où il peut aller jusqu'à 2 ml/100 g de poids corporel. Exception faite des substances irritantes ou corrosives, qui provoqueront normalement des effets exacerbés aux concentrations plus élevées, il convient de réduire au minimum la variabilité du volume d'essai en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à toutes les doses.

23. Si la substance d'essai est administrée dans les aliments ou l'eau de boisson, il importe de s'assurer que sa quantité n'interfère ni avec la nutrition normale ni avec l'équilibre hydrique. Lorsque la substance d'essai est incorporée aux aliments, deux possibilités sont offertes: soit le maintien d'une concentration constante dans les aliments (ppm), soit le maintien d'un niveau de dose constant par rapport au poids corporel des animaux; il y a lieu de préciser l'option choisie. Si la substance est administrée par gavage, la dose doit être administrée à la même heure chaque jour et ajustée si nécessaire pour rester constante par rapport au poids corporel de l'animal. Lorsqu'une étude à doses répétées sert de d'étude préliminaire à une étude de toxicité à long terme, il faut applique le même régime alimentaire dans les deux études.

Observations

24. La période d'observation doit durer 28 jours. Les animaux d'un groupe satellite destinés à des observations ultérieures ne doivent recevoir aucun traitement pendant au moins 14 jours en vue de détecter d'éventuels effets toxiques différés ou persistants, ou de mettre en évidence le rétablissement des animaux traités.

25. Les animaux doivent faire l'objet d'un examen clinique général au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en prenant en considération la période où les effets prévus devraient être les plus marqués après l'administration. L'état de santé des animaux doit être consigné. Au moins deux fois par jour, l'ensemble des animaux fait l'objet d'un constat de morbidité et de mortalité.

26. Tous les animaux doivent faire l'objet d'un examen clinique détaillé, une fois avant la première exposition (pour pouvoir effectuer des comparaisons sur un même individu), et ensuite au moins une fois par semaine. Ces observations doivent être effectuées hors de la cage habituelle, sur une aire standard, de préférence toujours au même moment de la journée. Elles doivent être soigneusement consignées, de préférence en utilisant un système de cotation, explicitement défini par le laboratoire qui réalise l'essai. Il faudrait s'efforcer de minimiser les variations des conditions d'essai et prendre les dispositions nécessaires pour que les examens soient effectués par des observateurs n'ayant pas connaissance du traitement. Les symptômes relevés devraient couvrir les observations suivantes (sans que cette liste soit exhaustive): modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux, des muqueuses, apparition de sécrétions et d'excrétions, et de réactions neuro-végétatives (par exemple, sécrétion de larmes, horripilation, dimension de la pupille, respiration anormale). Il convient également de consigner les changements dans la démarche, la posture et les réactions à la manipulation ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, des comportements stéréotypés (par exemple, toilettage excessif, parcours circulaires répétitifs) ou comportements bizarres (par exemple, automutilation, marche à reculons) (2).

27. Lors de la quatrième semaine d'exposition, il faut vérifier la réactivité sensorielle à différents types de stimuli (2) (stimuli auditifs, visuels et proprioceptifs, par exemple) (3) (4) (5), et évaluer la force de préhension (6) et l'activité motrice (7). On trouvera dans les références bibliographiques susmentionnées une description plus détaillée des modes opératoires. Toutefois, on peut également utiliser d'autres modes opératoires que ceux qui figurent dans les références.

▼M4

28. Les observations fonctionnelles réalisées au cours de la quatrième semaine d'exposition peuvent être omises lorsque l'essai sert d'étude préliminaire à une étude subchronique ultérieure (90 jours). Dans ce cas, les observations fonctionnelles devront être menées au cours de la seconde étude. Cela étant, les données tirées des observations fonctionnelles de l'étude à doses répétées peuvent faciliter la sélection des doses retenues pour l'étude subchronique ultérieure.

29. À titre exceptionnel, les observations fonctionnelles peuvent aussi être omises pour des groupes qui par ailleurs présentent des symptômes de toxicité à un degré tel qu'ils interféreraient sensiblement avec le déroulement de l'essai fonctionnel.

30. Lors de l'autopsie, le cycle œstral de l'ensemble des femelles peut être déterminé (facultatif) par frottis vaginal. Ces observations fourniront des informations sur le stade du cycle œstral atteint au moment de l'euthanasie et faciliteront l'évaluation histologique des tissus sensibles aux œstrogènes [voir le guide d'orientations sur l'histopathologie (19)].

Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau

31. Tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine. La consommation de nourriture doit également être mesurée au moins une fois par semaine. Si la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la consommation d'eau doit aussi être mesurée au moins une fois par semaine.

Hématologie

32. À la fin de la période d'essai, il faut procéder aux examens hématologiques suivants: hématocrite, concentration d'hémoglobine, numération des érythrocytes, reticulocytes, numération et formule leucocytaire, numération des plaquettes et mesure du temps et potentiel de coagulation. D'autres analyses devant être menées si la substance d'essai ou ses métabolites supposés ont ou sont susceptibles d'avoir des propriétés oxydantes portent notamment sur la concentration de méthémoglobine et les corps de Heinz.

33. Des échantillons de sang doivent être prélevés à un endroit spécifié juste avant ou pendant la procédure d'euthanasie des animaux, et stockés dans des conditions appropriées. Les animaux doivent avoir jeûné la nuit précédant l'euthanasie ([1]).

Biochimie clinique

34. Les analyses de biochimie clinique destinées à étudier les principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur le rein et le foie, devraient être pratiquées sur des échantillons de sang prélevés sur tous les animaux juste avant ou pendant leur euthanasie (à l'exception des animaux trouvés moribonds et/ou euthanasiés avant la fin de l'essai). Les analyses du plasma ou du sérum doivent porter sur le sodium, le potassium, le glucose, le cholestérol total, l'urée, la créatinine, la concentration totale de protéines et d'albumine, au moins deux enzymes indicatrices des effets hépatocellulaires (telles que l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase, la phosphatase alcaline, la gamma glutamyle transpeptidase et la glutamate déshydrogénase), ainsi que sur les acides biliaires. Le dosage d'autres enzymes (d'origine hépatique ou autre) et de la bilirubine, peut fournir des informations utiles dans certaines circonstances.

35. À titre facultatif, on peut effectuer les analyses d'urine suivantes au cours de la dernière semaine de l'étude sur des échantillons d'urine prélevés à des moments déterminés: apparence, volume, osmolalité ou poids spécifique, pH, protéines, glucose, sang et cellules sanguines.

([1]) Il est préférable de faire jeûner les animaux durant la nuit qui précède la prise de sang pour un certain nombre de dosages dans le sérum et le plasma, surtout pour le dosage du glucose. Cette recommandation est principalement motivée par l'accroissement de variabilité qui découlerait inévitablement d'une non- observation du jeûne et qui tendrait à masquer des effets plus subtils, rendant de ce fait l'interprétation des résultats plus difficile. En revanche, l'observation du jeûne durant une nuit entière risque de perturber le métabolisme général des animaux et, notamment lors d'études où la substance d'essai est administrée dans la nourriture, risque de perturber l'exposition quotidienne à la substance d'essai. Si la pratique du jeûne durant la nuit est adoptée, les analyses de biochimie clinique doivent être réalisées après les observations fonctionnelles faites au cours de la quatrième semaine de l'étude.

▼M4

36. Il faudrait envisager par ailleurs de rechercher dans le plasma ou le sérum des marqueurs de lésions générales des tissus. Si les propriétés connues de la substance d'essai risquent ou sont soupçonnées d'affecter certaines voies métaboliques, on devrait procéder à d'autres analyses, notamment celles du calcium, du phosphate, des triglycérides, d'hormones spécifiques et de la cholinestérase. La nécessité de ces analyses doit être déterminée pour certaines classes de produits chimiques ou au cas par cas.

37. Bien que l'évaluation internationale des paramètres liés au système endocrinien n'ait pas pu établir de façon claire l'intérêt de l'analyse des hormones thyroïdiennes (T3, T4) et de la TSH, il peut être utile de conserver des échantillons de plasma ou de sérum pour mesurer la T3, la T4 et la TSH (facultatif) s'il semble qu'un effet sur l'axe hypophyso-thyroïdien puisse exister. Ces échantillons pourront être congelés à - 20 °C pour être stockés. Les facteurs suivants peuvent influencer la variabilité et les concentrations absolues lors de l'analyse hormonale:

— moment de l'euthanasie, en raison de la variation diurne des concentrations hormonales,

— méthode d'euthanasie, évitant de stresser inutilement les animaux, ce qui pourrait affecter leurs concentrations hormonales,

— kits d'analyse hormonale pouvant différer par leurs courbes standards.

L'identification définitive des substances chimiques actives sur le système thyroïdien s'appuiera de manière plus fiable sur l'analyse histopathologique que sur les niveaux hormonaux.

38. Les échantillons de plasma destinés spécifiquement à l'analyse hormonale doivent être prélevés aux mêmes heures de la journée. Il est recommandé de prendre en considération les taux de T3, T4 et TSH provoqués par des altérations de l'histopathologie de la thyroïde. Les valeurs numériques obtenues lors de l'analyse des concentrations hormonales diffèrent selon les kits d'essai du commerce utilisés. Il peut ainsi ne pas être possible de fournir des critères de performance fondés sur des données historiques homogènes. Pour pallier cet inconvénient, les laboratoires s'efforceront de maintenir les coefficients de variation en dessous de 25 pour la T3 et pour la T4 et de 35 pour la TSH. Toutes les concentrations doivent être exprimées en ng/ml.

39. Si les données de référence historiques sont inappropriées, il conviendra de prendre en compte les variables d'hématologie et de biochimie clinique avant le début du dosage ou de préférence sur un groupe d'animaux distincts des groupes d'essai.

PATHOLOGIE

Autopsie générale

40. Tous les animaux utilisés dans l'étude feront l'objet d'une autopsie générale, complète et détaillée, qui comporte un examen approfondi de la surface externe du corps, de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Le foie, les reins, les glandes surrénales, les testicules, les épididymes, l'ensemble formé par la prostate, les vésicules séminales et les glandes coagulantes, le thymus, la rate, le cerveau et le cœur de tous les animaux (à l'exception des animaux moribonds et/ou euthanasiés avant la fin de l'essai) doivent être débarrassés, le cas échéant, de tout tissu adhérent et pesés à l'état frais dès que possible après la dissection, afin d'éviter leur dessiccation. Il convient d'enlever très soigneusement les tissus adhérents de l'ensemble de la prostate, de façon à éviter toute ponction de la vésicule séminale remplies de liquide. Une alternative consistera à débarrasser la vésicule séminale et la prostate des tissus adhérents et de les peser après fixation.

▼M4

41. De manière facultative, deux autres organes peuvent aussi être pesés dès que possible après la dissection, afin d'éviter leur dessiccation: les deux ovaires (poids frais) et l'utérus, y compris le col de l'utérus [des orientations sur l'ablation et la préparation des tissus utérins pour leur pesée sont données par la ligne directrice 440 de l'OCDE (18)].

42. Le poids de la thyroïde (facultatif) peut être déterminé après la fixation. L'élimination des tissus adhérents doit également s'opérer avec beaucoup de soin et seulement après la fixation pour éviter d'abîmer les tissus, et par là de compromettre l'analyse d'histopathologie.

43. Les tissus suivants doivent être conservés dans le milieu de fixation le plus approprié compte tenu à la fois du type de tissu et des examens histopathologiques prévus (voir paragraphe 47): toutes les lésions macroscopiques, l'encéphale (les régions représentatives du cerveau comprenant les hémisphères cérébraux, le cervelet et la protubérance annulaire), la moelle épinière, les yeux, l'estomac, l'intestin grêle, le gros intestin (y compris les plaques de Peyer), le foie, les reins, les glandes surrénales, la rate, le cœur, le thymus, la thyroïde, la trachée et les poumons (préservés par injection de fixateur, puis immergés), les gonades (testicules et ovaires), les organes génitaux auxiliaires (utérus et col de l'utérus, épididymes, prostate + vésicules séminales et glandes coagulantes), le vagin, la vessie, les ganglions lymphatiques [le ganglion lymphatique le plus proximal et un autre, en fonction de l'expérience du laboratoire (15)], un nerf périphérique (sciatique ou poplité interne), de préférence tout près du muscle, un muscle squelettique et un os, avec la moelle osseuse (coupe ou à défaut une ponction examinée immédiatement). Il est recommandé de fixer les testicules par immersion dans un fixateur de Bouin ou de Davidson modifié (16) (17). L'albuginée du testicule doit être ponctionnée délicatement et superficiellement aux deux pôles de l'organe avec une aiguille pour permettre la pénétration rapide du fixateur. Les résultats des observations cliniques et autres peuvent conduire à l'examen de tissus supplémentaires. En outre, il y a lieu de conserver tout organe qui pourrait être considéré comme un organe cible possible, eu égard aux propriétés connues de la substance d'essai.

44. Les tissus suivants peuvent apporter des informations utiles sur les effets endocriniens: gonades (ovaires et testicules), organes génitaux auxiliaires (utérus et col de l'utérus, épididymes, vésicules séminales et glande coagulante, prostate dorsolatérale et ventrale), vagin, hypophyse, glande mammaire mâle, glande thyroïdienne et glande surrénale. Les changements survenant dans les glandes mammaires mâles n'ont pas encore été insuffisamment documentés, mais ce paramètre peut s'avérer très sensible aux substances à action œstrogénique. L'observation des organes/tissus non cités au paragraphe 43 est facultative (voir appendice 2).

45. Le document d'orientation sur l'histopathologie (19) fournit des informations supplémentaires sur la dissection, la fixation, le prélèvement et l'histopathologie des tissus endocriniens.

46. Au cours du programme d'essais international, des éléments de preuve ont été apportés montrant que des effets subtils sur le système endocrinien de substances chimiques susceptibles de faiblement déséquilibrer l'homéostasie des hormones sexuelles peuvent être identifiés par leur capacité à perturber la synchronisation du cycle œstral dans différents tissus plutôt que par une nette altération histopathologique des organes sexuels femelles. Bien qu'aucune preuve définitive n'ait été apportée sur ces effets, il est recommandé que les preuves d'une asynchronie possible du cycle oestral soient prises en compte dans l'interprétation de l'examen histopathlogique des ovaires (cellules folliculaires, thécales et de la granulosa), de l'utérus, du col de l'utérus et du vagin. Si elle est évaluée (facultatif), la période du cycle déterminée par les frottis vaginaux peut également être incluse dans cette comparaison

▼M4

Histopathologie

47. Un examen histopathologique complet doit être pratiqué sur les tissus et organes conservés de tous les animaux appartenant au groupe témoin et au groupe traité à la dose la plus élevée. Ces examens devront être étendus aux animaux de tous les autres groupes de dosage dès lors qu'on observe des modifications liées au traitement dans le groupe traité à la dose la plus élevée.

48. Toutes les lésions macroscopiques seront examinées.

49. Si un groupe satellite est inclus, les tissus et organes sur lesquels des effets ont été observés dans les groupes traités doivent faire l'objet d'un examen histopathologique.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

50. Il faut présenter les résultats correspondant à chaque animal. En outre, toutes les données doivent être résumés sous forme de tableaux faisant apparaître, pour chaque groupe d'essai, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, le moment de la mort ou de l'euthanasie, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, et une description des ces signes, notamment le moment de leur apparition, leur durée et leur gravité, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions, leur gravité et le pourcentage d'animaux affecté par chaque type de lésion.

51. Dans la mesure du possible, les résultats numériques devraient être évalués par une méthode statistique appropriée et largement reconnue. La comparaison des effets au sein d'une même fourchette de dosage devrait éviter d'avoir à recourir à des tests de t multiples. Les méthodes statistiques devront être sélectionnées au stade de la conception de l'étude.

52. À des fins de contrôle de la qualité, il est suggéré de recueillir des données de contrôle historiques et de calculer les coefficients de variation pour les données numériques, en particulier pour les paramètres liés à la détection des perturbateurs endocriniens. Ces données peuvent être utilisées à des fins comparatives lorsque des études réelles sont évaluées.

Rapport d'essai

53. Le rapport d'essai doit inclure les informations suivantes:

Substance d'essai:

— état physique, pureté et propriétés physico-chimiques,

— données permettant l'identification chimique.

Véhicule, le cas échéant:

— justification du choix du véhicule, s'il est autre que l'eau.

Animaux d'essai:

— espèce/souche utilisée,

— nombre, âge et sexe des animaux,

— source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,

— poids de chaque animal au début de l'essai,

— justification du choix de l'espèce s'il ne s'agit pas de rat.

Conditions d'essai:

— justification du choix des doses,

— description détaillée de la préparation de la substance à tester et/ou de son incorporation dans la nourriture, la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation,

▼**M4**

— détails relatifs à l'administration de la substance d'essai,

— conversion de la concentration de la substance d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson (en ppm) en dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu,

— détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau.

Paramètres optionnels étudiés:

— liste des paramètres facultatifs étudiés.

Résultats:

— poids corporel/variation du poids corporel,

— consommation de nourriture et d'eau, le cas échéant,

— données sur la réponse toxique par sexe et par dose et description des symptômes de toxicité,

— nature, gravité et durée des observations cliniques (réversibles ou non),

— évaluations de l'activité sensorielle, de la force de préhension et de l'activité motrice,

— analyses de sang et valeurs normales de référence,

— analyses de biochimie clinique et valeurs normales de référence,

— poids corporel lors de l'euthanasie et poids des organes,

— résultats d'autopsie,

— description détaillée de tous les résultats des examens histopathologiques,

— données relatives à l'absorption, si elles sont disponibles,

— traitement statistique des résultats, s'il y a lieu.

Discussion des résultats

Conclusions

▼**M4**

Appendice 1

DÉFINITIONS

Activité antiandrogénique: capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone androgénique naturelle (par exemple la testostérone) chez un mammifère.

Activité antiœstrogénique: capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone œstrogénique naturelle (par exemple l'œstradiol 17ß) chez un mammifère.

Activité antithyroïdienne: capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone thyroïdienne naturelle (par exemple la T3) chez un mammifère.

Activité thyroïdienne: capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone thyroïdienne naturelle (par exemple la T3) chez un mammifère.

Androgénicité: capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone androgénique naturelle (par exemple la testostérone) chez un mammifère.

CSENO: sigle pour «concentration (maximale) sans effet nocif observé», c'est-à-dire la dose la plus élevée à laquelle aucun effet nocif lié au traitement n'est observé.

Dosage: terme général recouvrant la dose, sa fréquence et la durée de l'administration

Dose: quantité de substance d'essai administrée. La dose est exprimée en poids de substance d'essai par unité de poids de l'animal d'expérience par jour (par exemple en mg/kg de poids corporel/jour), ou en concentration constante dans la nourriture.

Œstrogénicité: capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone œstrogénique naturelle (par exemple l'œstradiol 17ß) chez un mammifère.

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Toxicité manifeste: terme général désignant des signes évidents de toxicité qui surviennent à la suite de l'administration d'une substance d'essai. Ces signes doivent être suffisants pour permettre l'évaluation des dangers et doivent être tels qu'on puisse s'attendre à ce qu'une augmentation de la dose administrée entraîne l'apparition de signes de toxicité grave et probablement la mort.

Validation: processus scientifique destiné à caractériser les impératifs opérationnels et les limites d'une méthode d'essai et à démontrer sa fiabilité et sa pertinence pour un objectif particulier.

▼M4

Appendice 2

Paramètres recommandés dans la méthode d'essai B.7 pour la détection des perturbateurs endocriniens

Paramètres obligatoires	Paramètres facultatifs
Poids	
— Testicules	— Ovaires
— Épididymes	— Utérus, y compris col de l'utérus
— Glandes surrénales	— Thyroïde
— Prostate + vésicules séminales et glandes coagulantes	
Histopathologie	
— Gonades:	— Frottis vaginaux
— Testicules et	— Glandes mammaires mâles
— Ovaires	— Hypophyse
— Organes sexuels auxiliaires:	
— Épididymes,	
— Prostate + vésicules séminales et glandes coagulantes	
— Utérus, y compris col de l'utérus	
— Glandes surrénales	
— Thyroïde	
— Vagin	
Dosages hormonaux	
	— Niveaux circulants de T3 et de T4
	— Niveaux circulants de TSH

BIBLIOGRAPHIE:

(1) OCDE (Paris, 1992). Rapport du président de la réunion du groupe de travail ad hoc d'experts sur la neurotoxicité systémique à court terme (et différée).

(2) PISC (1986). Principes et méthodes de la neurotoxicité liée à l'exposition aux produits chimiques. Critères d'hygiène de l'environnement n° 60.

(3) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(4) Gad S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691-704.

(5) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(6) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

▼**M4**

(7) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(8) OCDE (1998). Rapport de la première réunion du Groupe d'étude sur les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens, 10 et 11 mars 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(9) OCDE (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

(10) OCDE (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

(11) OCDE (2012).Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr 2649 37407 2348794 1 1 1 37407,00.html

(12) OCDE (2006). Compte rendu final de la réunion du Groupe de gestion de la validation pour les essais sur les mammifères. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

(13) OCDE. Projet de compte rendu du Groupe d'étude sur les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

(14) OCDE (2000) Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(15) Haley P., Perry R., Ennulat D., Frame S., Johnson C., Lapointe J.-M., Nyska A., Snyder P.W., Walker D. et Walter G. (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404-407.

(16) Hess R.A., Moore B.J. (1993) Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, p. 52-85.

(17) Latendresse J.R., Warbrittion A.R., Jonassen H., Creasy D.M. (2002). Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.

(18) OCDE (2007). Ligne directrice pour les essais de produits chimiques de l'OCDE n° 440: Bio-essai utérotrophique chez les rongeurs: Essai de dépistage à court terme des propriétés œstrogéniques.

(19) OCDE. (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

B.8. TOXICITÉ SUBAIGUË PAR INHALATION: ÉTUDE SUR 28 JOURS

RÉSUMÉ

La présente méthode d'essai B.8 révisée a été conçue afin de caractériser pleinement la toxicité par inhalation de la substance d'essai, à la suite d'une exposition répétée sur une période de temps limitée (28 jours), et de fournir des données pour les estimations quantitatives des risques liés à l'inhalation. Des groupes de rongeurs, composés d'au minimum 5 mâles et 5 femelles, sont exposés 6 heures par jour, pendant 28 jours: a) à la substance d'essai à trois niveaux de concentration ou plus, b) à de l'air filtré (témoin négatif), et/ou c) au véhicule (groupe témoin du véhicule). Les animaux sont exposés en général 5 jours par semaine, mais il est aussi permis de les exposer 7 jours par semaine. Des mâles et des femelles sont toujours utilisés, mais peuvent être exposés à des niveaux de concentration différents si l'un des sexes est connu pour être plus sensible à une substance d'essai donnée. Afin de mieux caractériser la toxicité de la substance d'essai, la présente méthode d'essai laisse la possibilité au directeur de l'étude d'inclure des groupes satellites (réversibilité), des lavages broncho-alvéolaires (LBA), des tests neurologiques et des évaluations histopathologiques ou de pathologie clinique supplémentaires.

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 412 (2009) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Le texte original de la ligne directrice 412 sur la toxicité subaiguë par inhalation avait été adopté en 1981 (1). La présente méthode d'essai B.8 (équivalente à la ligne directrice 412) a été révisée pour prendre en compte l'état de la science et répondre aux exigences règlementaires actuelles et futures.

2. La présente méthode permet de caractériser les effets nocifs résultant d'une exposition quotidienne répétée, par inhalation, à une substance d'essai pendant 28 jours. Les données issues d'une étude sur la toxicité subaiguë par inhalation sur 28 jours peuvent être utilisées pour des estimations quantitatives de risques (si l'étude n'est pas suivie d'un essai de toxicité subchronique par inhalation sur une période de 90 jours, voir chapitre B.29 de la présente annexe). Ces données peuvent également fournir des informations permettant la détermination des concentrations pour des études à plus long terme comme l'essai de toxicité subchronique par inhalation sur une période de 90 jours. La présente méthode d'essai n'est pas spécifiquement destinée à tester les nanomatériaux. Le document d'orientation n° 39 (2) regroupe les définitions utilisées dans le contexte de cette méthode d'essai.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

3. Avant toute étude, le laboratoire d'essai devra prendre en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai afin d'améliorer la qualité de l'étude et de recourir le moins possible aux animaux. Parmi les informations utiles pour la détermination des concentrations d'essai appropriées, citons: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les résultats de tous les essais de toxicité in vitro ou in vivo auxquels elle a été soumise; son (ses) utilisation(s) escomptée(s) et les risques d'exposition humaine; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques sur les substances structurellement apparentées; ainsi que les données issues des essais de toxicité aiguë par inhalation. En cas de neurotoxicité, connue ou observée au cours de l'étude, le directeur de l'étude pourra décider d'inclure les évaluations jugées nécessaires, comme une batterie d'observations fonctionnelles (FOB) et des mesures de l'activité motrice. Bien que la durée des expositions par rapport à des examens spécifiques puisse être critique, l'exécution de ces activités supplémentaires n'interfère pas avec la conception de l'étude principale.

▼M4

4. Les dilutions de substances corrosives ou irritantes peuvent être testées à des concentrations qui permettront d'atteindre le degré de toxicité désiré, voir document d'orientation 39 (2). Lors de l'exposition des animaux à ces substances, les concentrations cibles sont assez faibles pour ne causer ni souffrance manifeste ni détresse, mais suffisantes pour prolonger la courbe concentration-réponse jusqu'à des niveaux correspondant à l'objectif scientifique et règlementaire de l'essai. Le choix de ces concentrations est fait au cas par cas, de préférence sur la base d'une étude préliminaire de détermination des concentrations, conçue de façon appropriée, et qui fournit des informations sur l'effet critique mesuré, un éventuel seuil d'irritation et le moment de son apparition (voir paragraphes 11-13). La justification du choix des concentrations est fournie.

5. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés. Les animaux moribonds sont pris en compte au même titre que ceux qui succombent au cours de l'essai. Le document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (3) détaille les critères orientant la décision d'euthanasier les animaux moribonds ou en grande souffrance, et aide à reconnaître une mort prévisible ou imminente.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Sélection des espèces animales

6. Le choix s'orientera vers de jeunes rongeurs adultes en bonne santé, de souches communément utilisées en laboratoire. Le rat étant l'espèce la plus utilisée, il faudra justifier l'emploi d'autres espèces.

Préparation des animaux

7. Les femelles sont nullipares et non gravides. Le jour de la randomisation, les animaux sélectionnés sont de jeunes adultes âgés de 7 à 9 semaines. Leur poids corporel ne devra pas excéder ± 20 % du poids moyen pour chaque sexe. Sélectionnés au hasard, les animaux seront marqués pour être identifiés individuellement. En vue de leur acclimatation aux conditions de laboratoire, ils seront conservés dans leur cage pour une période d'au minimum 5 jours avant le début de l'essai.

Conditions d'élevage des animaux

8. Les animaux sont identifiés de façon individuelle, de préférence à l'aide de dispositifs sous-cutanés, afin de faciliter leur observation et d'éviter toute confusion. La température du local expérimental où les animaux sont conservés est maintenue à 22 ± 3 °C. Le taux d'humidité relative est idéalement maintenu entre 30 et 70 %, encore qu'il ne soit pas toujours possible de le faire si l'eau est utilisée comme véhicule. Avant et après exposition, les animaux sont généralement mis en cage en groupes par sexe et par concentration, mais le nombre d'animaux par cage ne fait pas obstacle à une observation précise de chaque animal, et n'engendrer qu'un minimum de pertes dues au cannibalisme et aux combats. Si les animaux sont exposés «nez seul», il peut être nécessaire de les acclimater aux tubes de contention. Ceux-ci ne provoquent pas chez les animaux de stress excessif, qu'il soit de nature physique, thermique ou dû à leur immobilisation. Les contraintes qu'ils subissent peuvent en effet modifier les paramètres physiologiques mesurés de l'animal, comme sa température corporelle (hyperthermie) et/ou son volume respiratoire par minute. Si l'on dispose de données génériques montrant que de telles modifications ne se produisent pas de façon appréciable, alors la période d'adaptation préalable aux tubes de contention n'est pas nécessaire. Les animaux exposés «corps entier» à un aérosol sont enfermés individuellement pendant l'exposition pour les empêcher de filtrer l'aérosol d'essai grâce à la fourrure de leurs congénères. À l'exception des périodes d'exposition, le régime alimentaire des animaux est le régime classique et certifié de laboratoire, avec eau potable à satiété. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité.

▼M4

Chambres d'inhalation

9. Le choix de la chambre d'inhalation prend en compte la nature de la substance d'essai et l'objet de l'essai. Le mode d'exposition «nez seul» (qui inclut les dispositifs «tête seule», «nez seul» et «museau seul») est privilégié. Le mode d'exposition «nez seul» est généralement choisi pour les études d'aérosols liquides ou solides et pour les vapeurs susceptibles de se condenser en aérosols. L'utilisation d'un mode d'exposition «corps entier» peut être préférable pour les besoins spécifiques de l'étude, mais cela est justifié dans le rapport de l'étude. Pour assurer la stabilité de l'atmosphère d'une chambre d'exposition «corps entier», on veillera à ce que le «volume» total des animaux d'expérience ne dépasse pas 5 % du volume de la chambre. Le document d'orientation 39 (2) décrit les principes des techniques d'exposition «corps entier» ou «nez seul», ainsi que leurs avantages et inconvénients spécifiques.

ÉTUDES DE TOXICITÉ

Concentrations limites

10. Contrairement aux études de toxicité aiguë, aucune concentration limite n'est définie pour les études de toxicité subaiguë par inhalation sur 28 jours. La concentration maximale testée prend en compte: 1) la concentration maximale pouvant être atteinte, 2) le niveau d'exposition humaine correspondant au «pire des cas», 3) la nécessité de maintenir une alimentation adéquate en oxygène, et/ou 4) le bien-être des animaux. En l'absence de limites fondées sur des données, les valeurs limites pour la toxicité aiguë du règlement (CE) n° 1272/2008 (13) peuvent être utilisées (c'est-à-dire jusqu'à une concentration maximale de 5 mg/l pour les aérosols, 20 mg/l pour les vapeurs et 20 000 ppm pour les gaz); voir document d'orientation 39 (2). S'il est nécessaire de dépasser ces limites lors d'essais de gaz ou de substances d'essai hautement volatiles (comme les réfrigérants), une justification est produite. La concentration limite permet d'obtenir une toxicité sans équivoque, sans causer de stress excessif chez les animaux ni affecter leur longévité (3).

Étude préliminaire de détermination des concentrations

11. Avant le début de l'étude principale, une étude préliminaire de détermination des concentrations peut s'avérer nécessaire. Plus complète qu'une étude d'observation, elle n'est pas limitée au choix des concentrations. Les connaissances acquises grâce à une étude préliminaire de détermination des concentrations peuvent conduire à la réussite de l'étude principale. En effet, une telle étude peut fournir des informations techniques sur les méthodes d'analyse, la taille des particules, la découverte de mécanismes de toxicité, les données histopathologiques et de pathologie clinique, et les estimations de la concentration sans effet nocif observé (CSENO) et de la concentration maximale acceptable (CMA) dans une étude principale. Le directeur d'étude peut décider de s'appuyer sur une étude préliminaire de détermination des concentrations pour identifier: le seuil d'irritation de l'appareil respiratoire (par exemple avec une histopathologie de l'appareil respiratoire, des tests de la fonction pulmonaire ou des lavages bronchoalvéolaires), la concentration la plus élevée tolérée par les animaux sans provoquer de stress excessif, et les paramètres qui permettront de caractériser au mieux la toxicité de la substance d'essai.

12. Une étude préliminaire de détermination des concentrations peut comporter un ou plusieurs niveaux de concentration. Pour chaque niveau de concentration, on exposera au maximum trois mâles et trois femelles. La durée d'une étude préliminaire de détermination des concentrations est d'au minimum 5 jours et ne pas excéder 14 jours en général. Il convient d'exposer dans le rapport d'étude les raisons du choix des concentrations retenues pour l'étude principale, dont l'objet est de démontrer une relation concentration-réponse basée sur l'effet mesuré le plus sensible auquel on s'attend. La concentration la plus faible n'engendre en principe aucune manifestation de toxicité, tandis que la concentration la plus élevée permet d'obtenir une toxicité sans équivoque, sans causer de stress excessif chez les animaux ni affecter leur longévité (3).

▼M4

13. Lors du choix des niveaux de concentration pour l'étude préliminaire de détermination des concentrations, toutes les informations disponibles sont prises en compte, y compris les relations structure-activité et les données correspondant à des produits chimiques analogues (voir paragraphe 3). Une étude préliminaire de détermination des concentrations peut confirmer ou réfuter le choix des effets mesurés les plus sensibles selon des critères mécanistiques, comme l'inhibition de la cholinestérase par des composés organophosphorés, la formation de méthémoglobine par des agents cytotoxiques d'isomérie érythro, les hormones thyroïdiennes (T3, T4) dans le cas de thyrotoxiques, les protéines, la LDH, ou les neutrophiles dans les lavages bronchoalvéolaires dans le cas de particules inoffensives faiblement solubles ou d'aérosols irritants pour les poumons.

Étude principale

14. L'étude principale de toxicité subaiguë comporte en général trois niveaux de concentration ainsi qu'un témoin négatif (air) et/ou un témoin du véhicule, s'il y a lieu (voir paragraphe 17). L'ensemble des informations disponibles doit permettre de déterminer les niveaux d'exposition appropriés, y compris les résultats des études systémiques de toxicité, le métabolisme et la cinétique (on prendra garde d'éviter les niveaux de concentration élevée avec des processus cinétiques de saturation). Chaque groupe d'essai comprend au moins 10 rongeurs (5 mâles et 5 femelles) exposés à la substance d'essai 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 4 semaines (soit une durée totale de l'étude de 28 jours). Les animaux peuvent aussi être exposés 7 jours par semaine (par exemple dans le cas d'essais sur des produits pharmaceutiques inhalés). S'il est connu qu'un des sexes est plus réactif à la substance d'essai, les niveaux de concentration peuvent différer selon le sexe afin d'optimiser la concentration-réponse telle que décrite au paragraphe 15. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées «nez seul», il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Lorsque la durée d'exposition est inférieure à 6 heures par jour ou qu'il est nécessaire de mener une étude d'exposition «corps entier» de longue durée (par exemple de 22 heures par jour), des justifications sont fournies, voir document d'orientation 39 (2). Les animaux sont privés de nourriture pendant l'exposition sauf si sa durée dépasse 6 heures. Dans une exposition «corps entier», les animaux peuvent boire de l'eau.

15. Les concentrations cibles choisies permettent d'identifier le(s) organe(s) cible(s) et de mettre en évidence une concentration-réponse claire:

— le niveau de concentration élevé produit des effets toxiques sans engendrer de signes persistants ou la mort, ce qui empêcherait une évaluation valable des résultats,

— le(s) niveau(x) de concentration intermédiaire(s) doi(ven)t être espacé(s) de manière à produire une gradation dans les effets toxiques observés avec une concentration faible et avec une concentration élevée,

— le niveau de concentration faible ne produit quasiment aucune manifestation de toxicité.

Étude satellite (étude de réversibilité)

16. Une étude de réversibilité peut être utilisée pour mettre en évidence le caractère réversible, persistant ou retardé de la toxicité, pour une période post-traitement d'une durée appropriée d'au minimum 14 jours. Les groupes satellites sont constitués de cinq mâles et de cinq femelles exposés en même temps que les animaux d'expérience de l'étude principale. Ils sont exposés à la concentration la plus élevée de la substance d'essai. Il convient également de faire appel à un témoin concurrent (air) et, le cas échéant, à un témoin du véhicule (voir paragraphe 17).

▼M4

Animaux témoins

17. Les animaux du groupe témoin négatif (air) sont traités d'une manière identique à ceux du groupe d'animaux d'essai, mais au lieu de la substance d'essai, ils sont exposés à de l'air filtré. Lorsque de l'eau ou une autre substance est utilisée pour produire l'atmosphère d'essai, un groupe témoin du véhicule est inclus dans l'étude, à la place du groupe témoin négatif exposé à l'air seulement. Autant que possible, l'eau est le véhicule utilisé. Dans ce cas, les animaux témoins sont exposés à un air dont le taux d'humidité relative est le même que pour les groupes exposés à la substance d'essai. Le choix du véhicule s'opère sur la base d'une étude préliminaire appropriée ou de données historiques. Si la toxicité d'un véhicule est mal connue, le directeur de l'étude peut choisir d'utiliser un témoin négatif (air) et un témoin du véhicule, mais cela est toutefois fortement déconseillé. Si les données historiques montrent qu'un véhicule n'est pas toxique, le groupe témoin à l'air n'est pas nécessaire et seul un témoin du véhicule est utilisé. Si aucune toxicité n'a été détectée lors de l'étude préliminaire d'une substance d'essai préparée dans un véhicule, ce véhicule est considéré comme non toxique à la concentration testée et ce véhicule témoin est utilisé.

CONDITIONS D'EXPOSITION

Administration des concentrations

18. Les animaux sont exposés à la substance d'essai présenté sous forme de gaz, de vapeur, d'aérosol ou d'un mélange des deux. L'état physique à tester dépend des propriétés physico-chimiques de la substance, de la concentration choisie, et/ou de la forme physique sous laquelle il est le plus probable qu'elle se présente lors de sa manipulation et de son utilisation. Les substances d'essai chimiquement réactives ou hygroscopiques sont testées sous air sec. On prendra soin d'éviter les concentrations susceptibles de provoquer une explosion. Les substances particulaires peuvent être soumises à des procédés mécaniques afin de réduire la taille des particules. Pour plus d'informations, se reporter au document d'orientation 39 (2).

Répartition granulométrique

19. Une mesure de la taille des particules est réalisée pour tous les aérosols et les vapeurs susceptibles se condenser pour former des aérosols. Pour que toutes les régions pertinentes de l'appareil respiratoire soient exposées, il est recommandé d'utiliser (4) des aérosols dont le diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) se situe entre 1 et 3 μm, avec un écart type géométrique (σ_g) compris entre 1,5 et 3,0. Un effort raisonnable est fourni pour remplir ces conditions, mais si tel n'est pas le cas, un jugement d'expert est nécessaire. Par exemple, les particules des fumées métalliques peuvent avoir une taille inférieure à cette norme, et les particules chargées ou les fibres une taille supérieure.

Préparation de la substance d'essai dans un véhicule

20. La substance d'essai est idéalement testée sans véhicule. S'il est nécessaire d'avoir recours à un véhicule pour atteindre la concentration et la taille particulaire voulues de la substance d'essai, l'eau est choisie de préférence. Chaque fois qu'une substance d'essai est dissoute dans un véhicule, sa stabilité est démontrée.

CONTRÔLE DES CONDITIONS D'EXPOSITION

Débit d'air dans la chambre d'exposition

21. Le débit d'air dans la chambre d'exposition est contrôlé avec soin, surveillé en continu et enregistré au moins toutes les heures pendant chaque exposition. Le suivi en temps réel de la concentration de l'atmosphère d'essai (ou stabilité temporelle) constitue une mesure complète de tous les paramètres dynamiques et fournit un moyen indirect de contrôler tous les paramètres d'inhalation dynamiques pertinents. Si la concentration est suivie en temps réel, la fréquence peut être ramenée à une seule mesure du débit de l'air par exposition et par jour. Un soin particulier est apporté à éviter toute

▼M4

rerespiration dans les chambres d'exposition «nez seul». La concentration d'oxygène est d'au moins 19 % et celle de dioxyde de carbone ne dépasser pas 1 %. Si ces conditions ne peuvent être respectées, les concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone sont mesurées. Si les mesures du premier jour d'exposition montrent que la concentration de ces gaz est appropriée, aucune mesure complémentaire ne devrait être nécessaire.

Température et humidité relative de la chambre d'exposition

22. La température de la chambre d'exposition est maintenue à 22 ± 3 °C. Dans les cas d'exposition «nez seul» et «corps entier», l'humidité relative dans la zone où respire l'animal est autant que possible surveillée en continu et enregistrée toutes les heures pendant chaque exposition. L'humidité relative est de préférence comprise entre 30 et 70 %. Il est possible que ce taux ne puisse être atteint (par exemple lorsque la substance d'essai se présente sous forme de solution aqueuse), ou qu'il ne puisse être mesuré en raison d'interférences de la substance d'essai avec la méthode d'essai.

Substance d'essai: concentration nominale

23. Dans la mesure du possible, la concentration nominale dans la chambre d'exposition est calculée et enregistrée. La concentration nominale est la masse de la substance d'essai divisée par le volume d'air total qui passe dans le circuit de la chambre d'inhalation. La concentration nominale ne sert pas à caractériser l'exposition des animaux, mais une comparaison de la concentration nominale avec la concentration réelle donne une indication de la capacité de production du système d'essai, et peut donc permettre de mettre en évidence des problèmes de production.

Substance d'essai: concentration réelle

24. La concentration réelle est la concentration de la substance d'essai prélevée dans la zone de la chambre d'inhalation où les animaux respirent. Les concentrations réelles peuvent être obtenues par des méthodes spécifiques (par exemple, échantillonnage direct, méthodes d'adsorption ou de réaction chimique, et caractérisation analytique ultérieure) ou par des méthodes non spécifiques comme la gravimétrie sur filtre. Le recours à l'analyse gravimétrique n'est acceptable que pour des aérosols ne contenant qu'un seul composant en poudre ou pour des aérosols de liquides peu volatils, et des caractérisations spécifiques à la substance d'essai sont également effectuées par une pré-étude appropriée. Il est aussi possible d'avoir recours à la gravimétrie pour déterminer la concentration d'un aérosol contenant plusieurs composants en poudre, mais des données analytiques sont alors nécessaires, afin de démontrer que la composition du produit en suspension dans l'air est analogue à celle du produit de départ. Faute de cette information, il peut s'avérer nécessaire de soumettre le produit à tester (idéalement en suspension dans l'air) à une nouvelle analyse à intervalles réguliers tout au long de l'étude. Pour des agents aérosolisés susceptibles de s'évaporer ou de se sublimer, il faut démontrer que toutes les phases ont été recueillies selon la méthode choisie.

25. Pendant toute la durée de l'étude, il est recommandé de n'employer si possible qu'un seul lot de la substance d'essai, et l'échantillon de la substance est conservé dans des conditions préservant sa pureté, son homogénéité et sa stabilité. Avant le début de l'étude, il conviendrait de réaliser une caractérisation de la substance d'essai afin de déterminer sa pureté et, si cela est techniquement possible, son identité et les quantités de contaminants et d'impuretés identifiés. Pour cela, on pourra recueillir les données suivantes: temps de rétention et surface relative du pic, poids moléculaire obtenu par spectroscopie de masse ou chromatographie en phase gazeuse, ou autres estimations. Bien que le laboratoire d'essai ne soit pas responsable de l'identification de la substance d'essai, il peut, par prudence, confirmer au moins une partie des caractéristiques fournies par le donneur d'ordre (couleur, nature physique, etc.).

▼M4

26. L'atmosphère d'exposition est maintenue constante autant que possible. Un dispositif de suivi en temps réel, tel qu'un photomètre à aérosol pour les aérosols ou un analyseur d'hydrocarbures totaux pour les vapeurs, peut être utilisé pour démontrer la stabilité des conditions d'exposition. La concentration réelle dans la chambre est mesurée au moins 3 fois chaque jour d'exposition et pour chaque niveau d'exposition. En cas d'impossibilité en raison de débits d'air limités ou de faibles concentrations, l'utilisation d'un échantillon par période d'exposition est acceptée. En principe, cet échantillon est alors recueilli pendant la totalité de la période d'exposition. Les écarts entre la concentration dans chaque chambre et la concentration moyenne n'excèdent pas ± 10 % pour les gaz et vapeurs et ± 20 % pour les aérosols liquides ou solides. Il convient de calculer et de noter le temps d'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}). La durée d'une exposition couvre le temps de production de la substance d'essai, y compris le temps nécessaire pour l'égalisation des concentrations dans la chambre d'exposition (t_{95}) et leur déclin. Des indications pour l'estimation de t_{95} sont fournies dans le document d'orientation 39 (2).

27. Pour des systèmes très complexes constitués de gaz ou de vapeurs et d'aérosols (atmosphères de combustion et substances d'essai propulsées à partir de produits/dispositifs spécialisés, par exemple), chaque phase peut se comporter différemment dans la chambre d'inhalation. Pour chacune des phases (gaz ou vapeur et aérosol), on choisira donc au moins une substance indicatrice (analyte), en général la principale substance active du mélange. Quand la substance d'essai est un mélange, la concentration analytique devra être indiquée pour le mélange global et pas uniquement pour le principe actif ou la substance indicatrice (analyte). Pour plus d'informations sur les concentrations réelles, se reporter au document d'orientation 39 (2).

Substance d'essai: répartition granulométrique

28. La répartition granulométrique des aérosols est déterminée au minimum chaque semaine pour chaque niveau de concentration, à l'aide d'un impacteur en cascade ou d'un autre instrument, comme un spectromètre de mesure de la taille des particules aérodynamiques (APS). Si les résultats obtenus avec l'impacteur en cascade et l'autre instrument se révèlent équivalents, ce dernier peut être utilisé tout au long de l'étude.

29. Pour confirmer la capacité de recueil des particules de l'outil principal, un second instrument devra être utilisé en parallèle, par exemple un filtre gravimétrique ou un barboteur à gaz/impacteur. La concentration massique obtenue par l'analyse granulométrique se rapproche, dans des limites raisonnables, de celle obtenue par l'analyse sur filtre, voir document d'orientation 39 (2). Si pour toutes les concentrations testées, cette équivalence est établie au début de la phase d'étude, il n'est pas nécessaire d'effectuer des mesures de confirmation dans la suite de l'étude. Pour le bien-être des animaux, il convient de réduire au minimum les données douteuses qui nécessiteraient de répéter l'essai.

30. Une répartition granulométrique est effectuée dans le cas des vapeurs, s'il est possible qu'une condensation de la vapeur conduise à la formation d'un aérosol, ou si des particules sont détectées dans une atmosphère de vapeur susceptible de présenter des phases mixtes.

OBSERVATIONS

31. Un examen clinique attentif des animaux est pratiqué avant, pendant, et après la période d'exposition. Des observations plus fréquentes peuvent être réalisées en fonction de la réponse des animaux pendant l'exposition. Lorsque l'observation des animaux s'avère difficile en raison des tubes de contention, du mauvais éclairage des chambres d'exposition «corps entier» ou d'atmosphères opaques, les animaux seront observés attentivement après l'exposition. Les observations effectuées avant l'exposition du lendemain peuvent permettre d'estimer une éventuelle réversibilité ou exacerbation des effets toxiques.

▼M4

32. Toutes les observations sont enregistrées individuellement pour chaque animal. Quand des animaux sont retrouvés morts ou sont euthanasiés, l'heure de la mort est consignée le plus précisément possible.

33. Les observations quotidiennes portent notamment sur les modifications de la peau et des poils, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux, ainsi que de l'activité somatomotrice et du comportement. Les tremblements, les convulsions, la salivation, les diarrhées, la léthargie, le sommeil et le coma retiennent l'attention. La mesure de la température rectale peut aider à mettre en évidence une bradypnée réflexe ou une hypo/hyperthermie liée au traitement ou au confinement. Il est possible d'enrichir le protocole d'étude par des estimations complémentaires telles que: cinétique, surveillance biologique, fonction pulmonaire, rétention de produits peu solubles qui s'accumulent dans les tissus pulmonaires et changements comportementaux.

POIDS CORPOREL

34. Le poids de chacun des animaux est enregistré individuellement: juste avant la première exposition (jour 0), deux fois par semaine par la suite (par exemple les vendredis et lundis, afin de mettre en évidence leur rétablissement après un week-end sans exposition, ou dans un délai permettant l'évaluation de la toxicité systémique), et au moment de leur mort ou de leur euthanasie. Si aucun effet n'est observé les 2 premières semaines, le poids corporel peut n'être mesuré qu'une fois par semaine pendant le reste de l'étude. Les animaux du groupe satellite (étude de réversibilité) sont toujours pesés de façon hebdomadaire tout au long de la période de récupération. Au terme de l'étude, tous les animaux sont pesés juste avant leur sacrifice pour ne pas fausser le calcul des rapports du poids des organes au poids du corps.

CONSOMMATION D'EAU ET DE NOURRITURE

35. La quantité de nourriture consommée est mesurée une fois par semaine. La consommation d'eau peut également l'être.

PATHOLOGIE CLINIQUE

36. Tous les animaux, y compris ceux des groupes témoins et satellites, quand ils sont sacrifiés, subissent des examens cliniques. Le délai entre la fin de l'exposition et la prise de sang est enregistré, en particulier quand la reconstitution de l'effet visé est rapide. À la fin de l'exposition, un échantillonnage est recommandé pour les paramètres ayant une courte demi-vie plasmatique (HbCO, ChE et MetHb, par exemple).

37. Le tableau 1 énumère les paramètres de pathologie clinique généralement requis pour toutes les études toxicologiques. Une analyse d'urine n'est pas nécessaire en règle générale, mais peut être réalisée si on l'estime utile d'après la toxicité probable ou observée. Afin de mieux caractériser la toxicité de la substance d'essai, le directeur de l'étude peut faire appel à d'autres paramètres (cholinestérase, lipides, hormones, équilibre acido-basique, méthémoglobine ou corps de Heinz, créatine kinase, rapport myéloïde/érythroïde, troponines, gaz du sang, lactate déshydrogénase, sorbitol déshydrogénase, glutamate déshydrogénase, gamma glutamyl transpeptidase, etc.).

▼M4

Tableau 1

Paramètres standards de pathologie clinique

Hématologie	
Nombre d'érythrocytes	Nombre total de leucocytes
Hématocrite	Différentiel leucocytaire
Concentration d'hémoglobine	Nombre de plaquettes sanguines
Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine	Potentiel de coagulation (en choisir un):
Volume corpusculaire moyen	— Temps de prothrombine
Concentration corpusculaire moyenne d'hémoglobine	— Temps de coagulation
Réticulocytes	— Temps de thromboplastine partielle

Chimie clinique	
Glucose (*)	Alanine aminotransférase
Cholestérol total	Aspartate aminotransferase
Triglycérides	Phosphatase alcaline
Azote uréique dans le sang	Potassium
Bilirubine totale	Sodium
Créatinine	Calcium
Protéines totales	Phosphore
Albumine	Chlore
Globuline	

Analyse d'urines (facultative)	
Apparence (couleur et turbidité)	Protéines totales
Volume	Glucose
Densité ou osmolarité	Sang/cellules sanguines
pH	

(*) Le directeur d'étude décidera si une période de jeûne est nécessaire ou non pour les animaux, une longue période de jeûne pouvant conduire à des mesures de glucose partiellement erronées pour les animaux traités par rapport aux animaux témoins. La période de jeûne est appropriée à l'espèce utilisée: pour le rat, elle peut être de 16 heures environ (jeûne pendant sa nuit). La détermination de la glycémie à jeun peut être effectuée après la période de jeûne de la nuit, pendant la dernière semaine d'exposition, ou après la période de jeûne de la nuit précédant l'autopsie (avec, dans ce dernier cas, tous les autres paramètres de pathologie clinique).

38. Quand il est prouvé que les voies respiratoires basses (c'est-à-dire les alvéoles pulmonaires) sont le principal site de dépôt et de rétention, le lavage broncho-alvéolaire (LBA) peut alors être la technique de choix pour effectuer une analyse quantitative les paramètres de la relation dose-effet basée sur les hypothèses, en se concentrant sur l'alvéolite, l'inflammation pulmonaire et la phospholipidose. Ceci permet d'étudier convenablement l'évolution de la relation dose-effet et du décours temporel d'une lésion alvéolaire. Le fluide du LBA peut être analysé en se basant sur le nombre total et différentiel de leucocytes, les protéines totales et la lactate déshydrogénase. D'autres paramètres peuvent également être considérés, comme ceux mettant en évidence une lésion lysosomale, une phospholipidose, une fibrose, une inflammation allergique ou irritante, laquelle peut inclure la détermination de cytokines ou de chimiokines pro-inflammatoires. Les mesures liées au LBA complètent souvent les résultats des examens histopathologiques sans toutefois s'y substituer. Des indications sur la manière de réaliser un lavage de poumon sont disponibles dans le document d'orientation 39 (2).

▼M4

MACROPATHOLOGIE ET POIDS DES ORGANES

39. Tous les animaux d'expérience, y compris ceux morts au cours de l'essai et ceux écartés de l'étude pour des raisons de bien-être animal, subissent une exsanguination complète (si cela est possible) et une autopsie macroscopique. Il convient d'enregistrer le délai entre la fin de la dernière exposition de chaque animal et leur sacrifice. Lorsqu'un animal est découvert mort et que son autopsie n'est pas réalisable immédiatement, l'animal est réfrigéré (mais non congelé) à une température suffisamment basse pour minimiser l'autolyse. Les autopsies sont réalisées le plus tôt possible, en général dans un délai d'un à deux jours. Tous les changements macropathologiques sont enregistrés pour chaque animal en prêtant particulièrement attention aux voies respiratoires.

40. Le tableau 2 énumère les organes et tissus devant être conservés dans un milieu approprié lors de l'autopsie macroscopique en vue d'un examen histopathologique. La conservation des organes et tissus [entre crochets], et de tous les autres organes et tissus, est à la discrétion du directeur d'étude. Les organes indiqués **en gras** sont découpés et pesés à l'état humide, le plus tôt possible après la dissection, pour éviter leur dessiccation. La thyroïde et les épididymes ne sont pesés que si cela est nécessaire car leur découpe peut gêner l'évaluation histopathologique. Les organes et tissus sont fixés à l'aide de formol tamponné à 10 %, ou d'un autre fixateur approprié, dès que l'autopsie est effectuée, et pas moins de 24 à 48 heures avant le découpage, en fonction du fixateur utilisé.

Tableau 2

Organes et Tissus à Conserver Pendant L'autopsie Macroscopique

[Bulbe olfactif]	**Reins**
Capsules surrénales	**Testicules**
Cerveau (y compris les tronçons du cortex cérébral et de la moelle/du pont)	**Thymus**
Cœur	Thyroïde
Estomac	Tissus nasopharyngés [au moins 4 niveaux; 1 niveau comprenant le conduit du nasopharynx et le tissu lymphoïde associé à la muqueuse nasale (NALT)]
Foie	Trachée (au moins 2 niveaux comprenant 1 coupe longitudinale le long de la carène et 1 coupe transversale)
Ganglions lymphatiques depuis la région hilaire du poumon, spécialement pour les substances d'essai particulaires peu solubles. Pour des examens plus approfondis et/ou des études à but immunologique, d'autres ganglions lymphatiques peuvent être envisagés, comme ceux des régions médiastinale, cervicale/submandibulaire et/ou auriculaire.	Utérus
	Vésicules séminales
	[Vessie]
	[Yeux (rétine, nerf optique) et paupières]
Larynx (3 niveaux, dont 1 niveau qui comprend la base de l'épiglotte)	Toutes lésions macroscopiques
Moelle épinière (niveau cervical, au milieu du thorax et lombaire)	
Moelle osseuse (et/ou un aspirat frais)	
Œsophage	
Ovaires	
Poumons (tous les lobes sur un niveau, y compris les bronches principales)	
Rate	

▼M4

41. Les poumons sont retirés intacts, pesés et perfusés avec un fixateur approprié à une pression de 20 à 30 cm d'eau pour veiller à ce que l'architecture pulmonaire soit préservée (5). Les coupes sont recueillies pour tous les lobes sur un niveau, comprenant les bronches principales. Si un lavage du poumon est réalisé, le lobe qui n'a pas été lavé est sectionné sur trois niveaux (pas de coupe en série).

42. Au moins 4 niveaux des tissus nasopharyngés sont examinés, dont un devant comporter le conduit du nasopharynx (5) (6) (7) (8) (9) pour permettre un examen adéquat de l'épithélium squameux, transitionnel (respiratoire non-cilié), respiratoire (respiratoire cilié) et olfactif, ainsi que du tissu lymphatique (NALT) (10) (11). Trois niveaux du larynx sont examinés, dont un comprenant la base de l'épiglotte (12). Au moins deux niveaux de la trachée sont examinés, y compris une coupe longitudinale le long de la carène de la bifurcation des bronches extrapulmonaires et une coupe transversale.

HISTOPATHOLOGIE

43. Une évaluation histopathologique de tous les organes et tissus du tableau 2 est réalisée pour les animaux des groupes témoins et des groupes exposés à une concentration élevée de la substance d'essai, ainsi que pour les animaux qui meurent ou sont sacrifiés au cours de l'étude. On portera une attention particulière aux voies respiratoires, aux organes cibles et aux lésions macroscopiques. Les organes et tissus présentant des lésions dans le groupe exposé à une concentration élevée sont examinés pour tous les groupes. Le directeur de l'étude peut choisir de réaliser des évaluations histopathologiques pour d'autres groupes afin de mettre en évidence une relation concentration-réponse claire. Lorsqu'un groupe satellite (étude de réversibilité) est utilisé, il y a lieu d'effectuer un examen histopathologique pour tous les tissus et organes ayant laissé apparaître des effets dans les groupes traités. Lorsqu'un trop grand nombre de morts précoces ou d'autres problèmes survenant dans le groupe exposé à une concentration élevée compromettent la portée des résultats, le groupe exposé à la concentration immédiatement inférieure subit un examen histopathologique. On tentera de corréler les observations macroscopiques et les constatations au niveau microscopique.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

44. Pour chacun des animaux, les données suivantes sont fournies: poids corporel, consommation de nourriture, pathologie clinique, pathologie macroscopique, poids des organes et histopathologie. Les résultats des observations cliniques sont résumés sous la forme de tableaux et indiquent pour chaque groupe d'essai: le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes spécifiques de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, l'heure de la mort de chacun des animaux, la description et l'évolution dans le temps des effets toxiques ainsi que leur réversibilité, et les conclusions de l'autopsie. Tous les résultats, quantitatifs et fortuits, sont évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique généralement reconnue peut être utilisée; il y a lieu de sélectionner les méthodes statistiques au stade de la conception de l'étude.

Rapport d'essai

45. Le rapport d'essai contient les renseignements suivants:

Animaux d'expérience et conditions d'élevage

— Description des conditions d'encagement, y compris: nombre (ou évolution du nombre) d'animaux par cage, matériel de litière, température ambiante et taux d'humidité relative, photopériode et identification du régime alimentaire.

▼M4

— Espèces/souches utilisées et justification éventuelle de l'utilisation d'une espèce autre que le rat. Des données sources et historiques peuvent être fournies si elles proviennent d'animaux exposés à des conditions d'exposition, d'encagement et de jeûne similaires.

— Nombre, âge et sexe des animaux.

— Méthode de randomisation.

— Description d'un éventuel conditionnement préalable à l'essai, tel que régime alimentaire, quarantaine ou traitement de maladie.

Substance d'essai

— Nature physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (y compris isomérisation).

— Données d'identification et numéro CAS (Chemical Abstract Services) s'il est connu.

Véhicule

— Justification de l'emploi d'un véhicule et justification de son choix (s'il ne s'agit pas de l'eau).

— Données historiques ou concordantes démontrant que le véhicule n'interfère pas avec les résultats de l'étude.

Chambre d'inhalation

— Description détaillée de la chambre d'inhalation, y compris son volume et son schéma.

— Source et description de l'équipement utilisé pour l'exposition des animaux et pour la production de l'atmosphère.

— Équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité, la granulométrie et la concentration réelle.

— Source d'air et système de climatisation utilisé.

— Méthodes utilisées pour étalonner l'équipement afin d'assurer l'homogénéité de l'atmosphère d'essai.

— Différence de pression (positive ou négative).

— Orifices d'exposition par chambre («nez seul») ou emplacement des animaux dans la chambre («corps entier»).

— Stabilité de l'atmosphère d'essai.

— Situation des capteurs thermiques et hygrométriques et échantillonnage de l'atmosphère d'essai dans la chambre d'exposition.

— Traitement de l'air fourni/évacué.

— Débits d'air, débit d'air/orifice d'exposition («nez seul») ou rapport du volume de l'animal à la chambre («corps entier»).

— Temps nécessaire pour atteindre l'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}).

— Nombre de changements de volume par heure.

— Doseurs (s'il y en a).

Données concernant l'exposition

— Justification du choix de la concentration cible dans l'étude principale.

▼**M4**

— Concentrations nominales (masse totale de substance d'essai produite dans la chambre d'inhalation, divisée par le volume d'air traversant la chambre).

— Concentrations réelles de la substance d'essai obtenues dans la zone où respirent les animaux; pour les mélanges d'essai produisant des formes physiques hétérogènes (gaz, vapeurs, aérosols), chacun des constituants peut être analysé séparément.

— Toutes les concentrations d'air sont rapportées en unités de masse (mg/l, mg/m^3, etc.) plutôt qu'en unités de volume (ppm, ppb, etc.).

— Répartition granulométrique des particules, diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) et écart type géométrique (σg), ainsi que leur méthode de calcul. Les autres analyses de la taille de particules sont consignées.

Conditions expérimentales

— Détails sur la préparation de la substance d'essai, y compris sur les procédures utilisées pour réduire la taille des particules des solides ou pour préparer les solutions de la substance d'essai.

— Description (si possible avec schéma) de l'équipement utilisé pour produire l'atmosphère d'essai et pour exposer les animaux à celle-ci.

— Détails sur l'équipement utilisé pour contrôler la température et le taux d'humidité de la chambre ainsi que le débit d'air dans chambre (réalisation d'une courbe d'étalonnage).

— Détails sur l'équipement utilisé pour recueillir les échantillons servant à déterminer les concentrations dans la chambre et la répartition granulométrique.

— Détails sur la méthode de chimie analytique utilisée et la méthode de validation (notamment rendement de récupération de la substance d'essai à partir du milieu d'échantillonnage).

— Méthode de randomisation utilisée pour l'assignation des animaux aux groupes d'essai et aux groupes témoins.

— Détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (notamment origine/type de régime alimentaire, origine de l'eau).

— Justification du choix des concentrations d'essai.

Résultats

— Tableau présentant la température, le taux d'humidité et le débit d'air dans la chambre d'inhalation.

— Tableau de données sur les concentrations nominales et réelles dans la chambre d'inhalation.

— Tableau de données sur la taille des particules, notamment données analytiques sur le prélèvement d'échantillons, la répartition granulométrique et les calculs du DAMM et de σ_g.

— Tableau de données sur les réponses et le niveau de concentration pour chaque animal (pour les animaux montrant des signes de toxicité, notamment mortalité, nature, sévérité, moment d'apparition et durée des effets).

▼**M4**

— Tableau du poids de chacun des animaux.

— Tableau de la consommation de nourriture.

— Tableau des résultats de pathologie clinique.

— Résultats de l'autopsie et observations histopathologiques pour chaque animal, s'ils sont disponibles.

— Tableau de tous les autres paramètres mesurés.

Discussion et interprétation des résultats

— Un effort particulier est consacré à la description des méthodes utilisées pour répondre aux critères de la présente méthode d'essai, par exemple en ce qui concerne la concentration limite ou la taille des particules.

— La respirabilité des particules est abordée à la lumière des résultats d'ensemble, en particulier si les critères de taille des particules n'ont pu être remplis.

— La cohérence des méthodes utilisées pour déterminer les concentrations nominales et réelles, et la relation entre la concentration réelle et la concentration nominale, sont incluses dans l'appréciation d'ensemble de l'étude.

— La cause probable de la mort et le mode d'action prédominant (systémique ou local) sont abordés.

— Une explication est apportée s'il a fallu euthanasier des animaux qui souffraient ou montraient des signes de détresse sévère et persistante, en se basant sur les critères du document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (3).

— Le ou les organes cibles sont identifiés.

— La concentration sans effet nocif observé (CSENO) et la concentration minimale avec effet nocif observé (CMENO) sont déterminées.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) OCDE (1981). Toxicité à doses répétées par inhalation, Ligne directrice n° 412 d'origine, direction de l'environnement, OCDE, Paris.

(2) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(3) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Évaluation, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.

(4) Whalan J.E. et Redden J.C. (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth D.L., Tyler W.S., Plopper C.E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, p. 229-258.

(6) Young J.T. (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

(7) Harkema J.R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A., van Slootweg P.J., Feron V.J. (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes M.P. and Ward J.M. (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M., Morgan K.T. (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

(10) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hameleers D.M.H., Biewenga J, Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C., Sminia T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

(11) Kuper C.F., Arts J.H.E., Feron V.J. (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

(12) Lewis D.J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

(13) Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006 (JO L 353 du 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

Appendice 1

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼B

B.9. **TOXICITÉ À DOSES RÉPÉTÉES (28 JOURS) (ADMINISTRATION CUTANÉE)**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. DÉFINITIONS

Voir introduction générale, partie B (point B).

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance à tester est appliquée quotidiennement, à doses croissantes, sur la peau de plusieurs lots d'animaux d'expérience pendant une période déterminée, à raison d'une seule dose par lot, pendant une durée de 28 jours. Durant la période d'application, les animaux sont observés quotidiennement afin de déceler les signes de toxicité. Les animaux qui meurent en cours d'expérience ainsi que ceux qui sont encore en vie à l'issue de l'expérience sont autopsiés.

1.5. CRITÈRE DE QUALITÉ

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.6.1. **Préparation**

Les animaux sont maintenus dans des conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience au minimum pendant les 5 jours qui la précèdent. Avant l'expérience, des animaux jeunes et sains sont répartis selon les règles du hasard entre les différents lots témoins et traités. Peu de temps avant l'essai, on tond la région dorsale du tronc des animaux. On peut avoir recours au rasage mais, dans ce cas, l'opération doit être effectuée 24 heures environ avant l'essai. Il est en général nécessaire de répéter les opérations de tonte ou de rasage à des intervalles d'une semaine environ, en évitant toute lésion de la peau. La surface à préparer pour l'application de la substance ne doit pas être inférieure à 10 % de la surface corporelle. Le poids de l'animal doit être pris en considération pour décider de la taille de la zone à épiler, et de la dimension de la surface à traiter. Lorsque le test concerne des substances solides qui, le cas échéant, peuvent être pulvérisées, la substance à tester doit être humectée au moyen d'eau ou, au besoin, d'un véhicule approprié, de manière à garantir un bon contact avec la peau. Les substances liquides sont généralement appliquées non diluées. On procède à une application quotidienne à raison de 5 à 7 jours par semaine.

1.6.2. **Conditions de l'essai**

1.6.2.1. *Animaux d'expérience*

On peut utiliser des rats, des lapins ou des cobayes adultes. On peut également utiliser d'autres espèces, mais il faut dans ce cas en justifier l'utilisation.

▼B

Au début de l'essai, l'intervalle de variation du poids des animaux utilisés ne doit pas excéder ± 20 % de la valeur moyenne requise.

1.6.2.2. *Nombre et sexe*

Dix animaux au moins (cinq femelles et cinq mâles), à la peau saine, sont utilisés pour chaque dose. Les femelles doivent être nullipares et non-gravides. S'il est prévu dans le protocole expérimental des sacrifices intermédiaires en cours d'expérience, il y a lieu d'ajouter la quantité d'animaux nécessaire pour ces sacrifices. De plus, un lot satellite de 10 animaux (5 par sexe) peut être traité à la dose la plus élevée pendant 28 jours et faire l'objet d'une observation relative à la réversibilité, la persistance ou l'apparition tardive d'effets toxiques durant les 14 jours qui suivent l'arrêt du traitement. On utilise aussi un lot satellite témoin de 10 animaux (cinq animaux par sexe).

1.6.2.3. *Doses*

On utilise au moins trois doses ainsi qu'un lot témoin ou, le cas échéant, un lot témoin traité avec le véhicule. La période d'exposition devra être d'au moins 6 heures par jour. La substance à tester doit être appliquée chaque jour au même moment et les quantités à administrer doivent faire l'objet d'une adaptation régulière (hebdomadaire ou bihebdomadaire) afin de conserver un niveau de dose constant par rapport au poids corporel des animaux. Excepté l'administration de substance d'essai, les animaux du lot témoin doivent être traités de la même manière que les animaux des lots d'expérience. Lorsqu'un véhicule est utilisé pour faciliter l'administration, celui-ci sera administré au lot témoin dans les mêmes conditions qu'aux lots traités et la quantité de véhicule correspondra à celle reçue par le groupe traité avec la dose de substance d'essai la plus élevée. La dose la plus élevée doit être suffisamment forte pour produire des effets toxiques mais sans toutefois entraîner la mort (ou rarement). La dose la plus faible ne doit faire apparaître aucun effet toxique. Lorsque l'on dispose d'une estimation concernant l'exposition de l'homme, la dose la plus faible doit être supérieure à cette valeur. Dans les conditions idéales, la concentration intermédiaire doit produire des effets toxiques minimaux observables. Si l'on utilise plusieurs concentrations intermédiaires, celles-ci doivent être espacées de façon à entraîner une gradation des effets toxiques. En cas de mortalité dans les lots recevant les doses faibles et intermédiaires, ainsi que dans les lots témoins, celle-ci devra être minime pour que l'évaluation des résultats soit valable.

Si l'application de la substance d'essai provoque une irritation cutanée grave, les concentrations doivent être réduites, ce qui peut entraîner une diminution, voire une disparition, des autres effets toxiques à la dose la plus élevée. De plus, si les lésions cutanées sont très graves, il peut se révéler nécessaire d'arrêter l'expérience et de la recommencer avec des concentrations plus faibles.

1.6.2.4. *Essai «limite»*

Si une expérience préliminaire réalisée avec une dose de 1 000 mg/kg de poids corporel ou avec une dose plus élevée en fonction de l'exposition possible pour l'homme, n'a provoqué aucun effet toxique, il peut s'avérer inutile de poursuivre l'expérience.

1.6.2.5. *Période d'observation*

Les animaux d'expérience doivent faire l'objet d'une observation quotidienne afin de déceler les symptômes d'intoxication. Le moment où les symptômes d'intoxication apparaissent et disparaissent ainsi que le moment de la mort doivent être consignés.

▼B

1.6.3. **Mode opératoire**

Les animaux doivent être placés dans des cages individuelles. Dans les conditions idéales, la substance d'essai est administrée aux animaux 7 jours sur 7, pendant une période de 28 jours. Les animaux de tous les lots satellites destinés à des observations complémentaires doivent être gardés en vie pendant 14 jours encore, sans traitement, afin de constater la régression ou la persistance des effets toxiques. La durée de l'exposition doit être au moins de 6 heures par jour.

La substance d'essai doit être appliquée uniformément sur une surface représentant environ 10 % de la surface corporelle totale mais lorsqu'il s'agit de substances hautement toxiques, la surface couverte peut être réduite. La couche de substance doit être aussi mince et uniforme que possible.

Durant l'exposition, la substance d'essai est maintenue en contact avec la peau au moyen d'une compresse de gaze poreuse et d'un sparadrap non irritant. La surface traitée doit, en outre, être convenablement couverte de manière à maintenir en place le pansement de gaze et la substance d'essai et de manière à éviter que les animaux puissent ingérer la substance à tester. Des appareils de contention peuvent être utilisés pour empêcher l'ingestion de la substance mais une immobilisation complète n'est pas recommandée. Il est également possible d'utiliser la technique du «collier de protection».

À l'issue de la période d'exposition, il faut, si possible, éliminer la substance résiduelle avec de l'eau ou par tout autre procédé adéquat de nettoyage de la peau.

Tous les animaux doivent être observés quotidiennement et les signes de toxicité ainsi que le moment de leur apparition, leur intensité et leur durée doivent être notés. Les observations doivent concerner les modifications de la peau et des poils, des yeux, des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire ainsi que des systèmes nerveux autonome et central, de l'activité somatomotrice et du comportement. Les animaux doivent être pesés chaque semaine. Il est également recommandé d'effectuer des mesures hebdomadaires sur la consommation alimentaire des animaux. Il est nécessaire d'observer régulièrement les animaux afin de veiller à ce que, dans la mesure du possible, ceux-ci ne soient pas perdus pour l'expérience pour des raisons telles que cannibalisme, autolyse des tissus au cours des remises en cages. A l'issue de l'expérience, tous les animaux survivants appartenant aux lots traités, non satellites, sont autopsiés. Les animaux moribonds et les animaux dans un état de détresse ou de douleur intenses doivent être immédiatement retirés, euthanasiés et autopsiés.

Les examens figurant ci-après seront effectués à l'issue de la période d'essai sur tous les animaux (y compris les témoins):

1. examen hématologique comprenant au moins l'hématocrite, la concentration en hémoglobine, le dénombre ment des érythrocytes et des leucocytes, la formule leucocytaire ainsi qu'une étude de la coagulation;

2. examen biochimique clinique du sang comprenant au moins un paramètre des fonctions hépatiques et rénales: alanine aminotransférase sérique (anciennement connue sous le nom de transaminase glutamopyru-vique), aspartate aminotransférase sérique (anciennement connue sous le nom de transaminase glutano-oxalo-acétique), urée, albumine, créatinine, bilirubine totale et protéines sériques totales.

D'autres déterminations éventuellement nécessaires à une évaluation toxicologique adéquate concernent le calcium, le phosphore, les chlorures, le sodium, le potassium, la glycémie à jeun, l'analyse des lipides, les hormones, l'équilibre acido-basique, la méthémoglobine, l'activité cholinestérasique.

▼B

D'autres analyses biochimiques cliniques peuvent, si nécessaire, être effectuées pour approfondir l'étude des effets observés.

1.6.4. **Autopsie**

Tous les animaux soumis à l'essai doivent faire l'objet d'une autopsie macroscopique. Au moins le foie, les reins, les glandes surrénales et les testicules doivent être pesés à l'état humide le plus rapidement possible après la dissection afin d'éviter le dessèchement. Organes et tissus, à savoir, peau normale et traitée, foie, reins, rate, testicules, glandes surrénales, cœur et les organes-cibles (c'est-à-dire ceux qui présentent des lésions importantes ou des modifications de leur volume) doivent être conservés dans un milieu approprié en vue d'éventuels examens histopathologiques ultérieurs.

1.6.5. **Examen histopathologique**

Pour le lot exposé à la dose la plus élevée et le lot témoin, il faut pratiquer un examen histologique systématique de tous les organes et des tissus conservés. Les organes et tissus qui auront présenté des lésions attribuables à la substance à tester à la dose la plus élevée devront être examinés dans tous les lots ayant été exposés à des doses plus faibles. Les animaux de tout lot satellite devront faire l'objet d'un examen histologique particulièrement axé sur les organes et les tissus pour lesquels les lésions ont été constatées dans les lots traités.

2. **DONNÉES**

Les données doivent être récapitulées sous forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'expérience, nombre d'animaux au début de l'essai et le nombre d'animaux présentant chaque type de lésion.

Tous les résultats observés doivent être évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique reconnue peut être utilisée.

3. **RÉSULTATS**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

— données concernant les animaux (espèce, souche, origine, conditions ambiantes, régime alimentaire, etc.),

— conditions de l'essai, (y compris le type de pansement: occlusif ou non-occlusif),

— doses (avec, le cas échéant, le véhicule) et concentrations,

— dose sans effet, lorsque c'est possible,

— données relatives à la réponse toxique par sexe et par dose,

— indication du moment de la mort en cours d'expérience ou des survies au terme de l'expérience,

— effets toxiques ou autres,

— moment de l'observation de tout symptôme anormal et évolution de celui-ci,

— données relatives à la prise de nourriture et à l'évolution du poids corporel,

— examens hématologiques pratiqués et résultats complets,

▼B

— examens biochimiques cliniques pratiqués et résultats complets,

— résultats d'autopsie,

— description détaillée de tous les résultats histopathologiques,

— traitement statistique des résultats, si possible,

— discussion des résultats,

— interprétation des résultats.

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B (point D).

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B (point E).

▼M7

B.10. ESSAI D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE *IN VITRO* CHEZ LES MAMMIFÈRES

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 473 (2016) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Elle s'inscrit dans une série de méthodes d'essai sur la toxicologie génétique. Par ailleurs, un document de l'OCDE qui fournit des informations succintes sur les essais de génotoxicité et donne une vue d'ensemble des modifications récemment apportées à ces lignes directrices a été élaboré (1).

L'essai d'aberration chromosomique *in vitro* est destiné à détecter les produits chimiques qui provoquent des aberrations chromosomiques structurales dans des cellules de mammifère cultivées (2) (3) (4). Les aberrations structurales peuvent être de deux types: chromosomiques ou chromatidiques. Il est possible que des cas de polyploïdie (y compris d'endoreduplication) surviennent dans les essais d'aberration chromosomique *in vitro*. Si les aneugènes peuvent induire une polyploïdie, la polyploïdie seule n'est pas le signe d'un potentiel aneugène et peut simplement indiquer une perturbation du cycle cellulaire ou une cytotoxicité (5). Cet essai n'est pas conçu pour mesurer l'aneuploïdie. Pour détecter l'aneuploïdie, il est recommandé de réaliser un test du micronoyau *in vitro* (6).

L'essai d'aberration chromosomique *in vitro* peut être pratiqué sur des cultures de lignées cellulaires établies ou des cultures de cellules primaires d'origine humaine ou de rongeurs. Les cellules employées sont choisies en fonction de leur potentiel de croissance en culture, de la stabilité de leur caryotype (notamment leur nombre de chromosomes) et de la fréquence spontanée des aberrations chromosomiques (7). Les données disponibles à l'heure actuelle ne permettent pas d'émettre des recommandations fermes mais tendent à montrer qu'il importe de tenir compte, lors de l'évaluation des dangers chimiques, du statut du *p53*, de la stabilité génétique (caryotype), de la capacité de réparation de l'ADN et de l'origine (rongeurs ou humains) des cellules retenues pour l'essai. Les utilisateurs de la présente méthode d'essai sont donc invités à prendre en considération l'influence de ces caractéristiques cellulaires, et d'autres caractéristiques, sur les performances d'une lignée cellulaire quant à la détection de l'induction d'aberrations chromosomiques, sachant que les connaissances évoluent dans ce domaine.

Les définitions utilisées sont données à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

À moins que les cellules utilisées ne soient dotées d'un métabolisme compatible avec les produits chimiques testés, les essais conduits *in vitro* requièrent généralement une source exogène d'activation métabolique. Or, les systèmes d'activation métabolique exogène sont incapables de reproduire parfaitement les conditions *in vivo*. On prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de conduire à de faux résultats positifs, c'est-à-dire à une lésion chromosomique qui ne soit pas causée par une interaction directe entre le produit chimique d'essai et les chromosomes; ces conditions peuvent être une modification du pH ou de l'osmolalité (8) (9) (10), une interaction avec les composants du milieu (11) (12) ou une cytotoxicité excessive (13) (14) (15) (16).

Cet essai permet de détecter les aberrations chromosomiques pouvant résulter d'évènements clastogènes. L'analyse de l'induction d'une aberration chromosomique doit être effectuée sur des cellules en métaphase. Il est donc indispensable que les cellules des cultures traitées et des cultures témoins atteignent le stade de la mitose. Pour les nanomatériaux manufacturés, il peut s'avérer nécessaire d'apporter certaines adaptations spécifiques à cette méthode d'essai, mais ces adaptations ne sont pas décrites dans le présent document.

Avant d'utiliser la méthode d'essai sur un mélange pour générer des données avec pour objectif recherché l'application réglementaire, on examinera si, et si oui, pourquoi, elle peut fournir des résultats adéquats à cette fin. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé.

▼M7

PRINCIPE DE L'ESSAI

Des cultures cellulaires d'origine humaine ou provenant d'autres mammifères sont exposées au produit chimique d'essai, en présence et en l'absence d'une source exogène d'activation métabolique, à moins que les cellules utilisées ne soient dotées de capacités métaboliques idoines (voir paragraphe 13). Après avoir été exposées au produit chimique d'essai, les cultures de cellules sont, à intervalles préétablis, traitées par un produit chimique bloquant la métaphase (par exemple la colchicine ou le colcemide), récoltées et teintées. Les cellules en métaphase sont soumises à un examen microscopique permettant de déceler les aberrations chromatidiques et chromosomiques.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Préparations

Cellules

Diverses lignées cellulaires (par exemple, ovaire de hamster chinois (CHO), poumon de hamster chinois V79, poumon de hamster chinois (CHL)/IU, TK6) ou cultures de cellules primaires peuvent être utilisées, y compris des lymphocytes du sang périphérique humain ou d'autres mammifères (7). Le choix des lignées cellulaires utilisées doit être justifié scientifiquement. En cas d'utilisation de cellules primaires, pour des raisons relatives au bien-être des animaux, il conviendra d'envisager, lorsque cela est possible, le recours à des cellules primaires d'origine humaine, prélevées dans le respect des principes éthiques et de la réglementation en la matière. Les lymphocytes du sang périphérique humain utilisés sont issus de sujets jeunes (âgés de 18 à 35 ans environ), non fumeurs, ne souffrant d'aucune maladie connue et n'ayant pas été exposés récemment à des niveaux d'agents génotoxiques (produits chimiques, rayonnements ionisants, par exemple) susceptibles d'augmenter l'incidence de fond des aberrations chromosomiques, ceci afin de garantir que cette incidence soit faible et homogène. L'incidence de fond des aberrations chromosomiques augmente avec l'âge, et cette tendance est plus marquée chez la femme que chez l'homme (17) (18). Si des cellules issues de plusieurs donneurs sont mises en commun, le nombre des donneurs est précisé. Il est nécessaire de démontrer que les cellules se sont divisées entre le moment où elles ont été traitées avec le produit chimique d'essai et leur prélèvement. Les cultures cellulaires sont maintenues dans une phase de croissance exponentielle (lignées cellulaires) ou encouragées à se diviser (cultures primaires de lymphocytes) en vue de l'exposition des cellules à différents stades du cycle cellulaire, étant donné que la sensibilité des stades cellulaires aux produits chimiques d'essai peut ne pas être connue. En général, les cellules primaires dont la division doit être stimulée par des agents mitogènes ne sont plus synchronisées lors de leur exposition au produit chimique d'essai (les lymphocytes humains après une stimulation mitogène de 48 heures, par exemple). L'utilisation de cellules synchronisées pendant le traitement n'est pas recommandée mais peut être acceptable si elle est justifiée.

Milieu et conditions de culture

Il convient d'utiliser un milieu de croissance et des conditions d'incubation (récipients de culture, atmosphère humidifiée à 5 % de CO_2 si nécessaire, température d'incubation de 37°C) appropriées pour les cultures. La stabilité du caryotype et l'absence de contamination par des mycoplasmes sont vérifiées régulièrement dans les lignées cellulaires (7) (19), et les cellules sont écartées si une contamination ou une modification du caryotype est constatée. La durée normale du cycle cellulaire des lignées ou des cultures primaires utilisées dans le laboratoire d'essai doit être établie et doit correspondre aux caractéristiques cellulaires publiées (20).

Préparation des cultures

Lignées cellulaires: les cellules sont multipliées à partir de cultures mères, placées dans un milieu de culture à une densité telle que les cellules en suspension ou en monocouche poursuivront leur croissance de manière exponentielle jusqu'au moment de la récolte (il convient par exemple d'éviter que les cellules qui se multiplient en monocouche arrivent à confluence).

▼M7

Lymphocytes: un sang total traité avec un anticoagulant (héparine, par exemple) ou des lymphocytes isolés sont mis en culture (pendant 48 heures pour les lymphocytes humains, par exemple) en présence d'un mitogène [phytohémagglutinine (PHA) pour les lymphocytes humains, par exemple] afin d'induire une division cellulaire avant l'exposition au produit chimique d'essai.

Activation métabolique

Le recours à un système d'activation métabolique exogène est nécessaire en cas d'utilisation de cellules dotées d'une capacité métabolique endogène inadéquate. Le système le plus couramment utilisé, recommandé par défaut, sauf justification contraire, est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteur (S9), préparée à partir de foies de rongeurs (généralement des rats) traités avec des inducteurs enzymatiques comme l'Aroclor 1254 (21) (22) (23) ou un mélange de phénobarbital et ß-naphthoflavone (24) (25) (26) (27) (28) (29). L'utilisation de ce mélange n'est pas contraire à la Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants (30) et s'est révélée aussi efficace que celle de l'Aroclor 1254 pour l'induction d'oxydases à fonction mixte (24) (25) (26) (28). La fraction S9 est généralement utilisée à une concentration comprise entre 1 et 2 % (v/v) mais peut être portée à 10 % v/v dans le milieu d'essai final. Pendant le traitement, on évitera d'utiliser des produits entraînant une réduction de l'indice mitotique, en particulier des complexants du calcium (31). Le choix du type et de la concentration du système d'activation métabolique exogène ou de l'inducteur métabolique utilisé pourra dépendre de la classe des produits chimiques à tester.

Préparation du produit chimique d'essai

Les produits chimiques solides à tester sont dissous dans un solvant approprié puis, le cas échéant, dilués avant application (voir paragraphe 23). Les produits chimiques liquides peuvent être ajoutés directement ou après dilution au système d'essai. Les produits gazeux ou volatils nécessitent une modification appropriée des protocoles standards, par exemple l'utilisation de récipients de culture hermétiquement clos (32) (33) (34). Il convient de préparer les produits chimiques d'essai juste avant le traitement, à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'ils peuvent être stockés.

Conditions de l'essai

Solvants

Le solvant doit être choisi de manière à optimiser la solubilité des produits chimiques d'essai, sans engendrer d'effets néfastes sur la conduite de l'essai, c'est-à-dire sans modifier la croissance cellulaire, nuire à l'intégrité du produit chimique d'essai, réagir avec les récipients de culture ou détériorer le système d'activation métabolique. On recommande d'envisager d'abord l'utilisation d'un solvant (ou milieu de culture) aqueux chaque fois que c'est possible. L'eau et le diméthylsulfoxyde sont des exemples de solvants couramment utilisés. En règle générale, les solvants organiques ne doivent pas dépasser 1 % (v/v) et les solvants aqueux (salin ou eau) 10 % (v/v) dans le milieu de traitement final. L'emploi d'un solvant/véhicule inhabituel (éthanol ou acétone par exemple) doit être justifié par des données faisant état de sa compatibilité avec le produit chimique d'essai et le système d'essai, ainsi que de son absence de génotoxicité aux concentrations utilisées. En l'absence de telles données, il est important d'inclure dans l'essai des témoins non traités (voir appendice 1) afin de démontrer que le solvant choisi n'entraîne aucun effet délétère ou clastogène.

Mesure de la prolifération et de la cytotoxicité cellulaires et choix des concentrations d'essai

Lors de la détermination de la plus forte concentration de produit chimique d'essai à tester, on évitera les concentrations susceptibles de produire de fausses réponses positives, notamment celles qui engendrent une cytotoxicité excessive (voir paragraphe 22), une précipitation dans le milieu de culture (voir paragraphe 23), ou une modification marquée du pH ou de l'osmolalité

▼M7

(voir paragraphe 5). Si le produit chimique d'essai provoque une modification marquée du pH du milieu au moment de son ajout, il est possible d'ajuster le pH par tamponnage du milieu de traitement final de manière à éviter les faux résultats positifs et à maintenir des conditions de culture appropriées.

Des mesures de la prolifération cellulaire sont effectuées pour s'assurer qu'un nombre suffisant de cellules traitées a atteint la mitose pendant l'essai et que les applications sont réalisées à des niveaux de cytotoxicité appropriés (voir paragraphes 18 et 22). La cytotoxicité doit être mesurée lors de l'expérience principale avec et sans système d'activation métabolique, au moyen d'un indicateur pertinent de mort et de croissance cellulaires. Un essai préliminaire visant à évaluer la cytotoxicité peut s'avérer utile pour mieux cerner les concentrations à utiliser dans l'essai principal, mais il n'est pas obligatoire. S'il est réalisé, il ne doit pas remplacer la mesure de cytotoxicité effectuée dans le cadre de l'expérience principale.

La mesure du doublement relatif de la population (*Relative Population Doubling*, RPD) et celle de l'augmentation relative du nombre de cellules (*Relative increase in cell count,* RICC) sont des méthodes adaptées pour évaluer la cytotoxicité dans les essais de cytogénétique (13) (15) (35) (36) (55) (voir formules à l'appendice 2). En cas de traitement de longue durée et lorsque les prélèvements sont effectués au-delà de 1.5 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement (soit plus de 3 cycles cellulaires au total), il se peut que le RPD sous-estime la cytotoxicité (37). Dans ces circonstances, la RICC pourrait constituer une meilleure mesure, mais l'évaluation de la cytotoxicité à l'aide du RPD après une durée équivalente à 1.5 fois la durée normale du cycle cellulaire fournit néanmoins une estimation précieuse.

Si l'indice mitotique (MI) mesure les effets cytotoxiques/cytostatiques sur les lymphocytes dans les cultures primaires, il est aussi influencé par le temps écoulé entre le début de l'exposition et le moment de la mesure, par le mitogène employé et par une éventuelle interruption du cycle. Toutefois, le MI constitue une mesure acceptable, car d'autres mesures de toxicité peuvent s'avérer laborieuses et peu pratiques, et ne pas forcément s'appliquer à la population cible de lymphocytes se développant en réponse à une stimulation par PHA.

Les paramètres de cytotoxicité recommandés sont la RICC et le RPD pour les lignées cellulaires, et le MI pour la culture primaire des lymphocytes; néanmoins, d'autres indicateurs (tels que l'intégrité cellulaire, l'apoptose, la nécrose et le cycle cellulaire) peuvent fournir d'autres informations utiles.

Il convient d'évaluer au moins trois concentrations d'essai (sans compter les témoins de solvant et les témoins positifs) remplissant les critères d'acceptabilité (cytotoxicité appropriée, nombre de cellules, etc.). Quel que soit le type de cellules (lignées cellulaires ou cultures primaires de lymphocytes), chacune des cultures réalisées en un seul ou plusieurs exemplaires peut être utilisée à chaque concentration d'essai. Alors que l'utilisation de cultures en double exemplaires est recommendé, l'utilisation de cultures en exemplaire unique est aussi acceptée à condition que le nombre total de cellules analysées par concentration reste identique qu'il s'agisse de cultures uniques ou de répliques. L'utilisation de cultures uniques est pertinent en particulier lorsqu'on évalue plus de 3 concentrations (voir paragraphe 31). Les résultats obtenus pour chacune des répliques (cultures réalisées en plusieurs exemplaires) à une concentration donnée peuvent être regroupés pour l'analyse des données (38). Pour les produits chimiques dont la cytotoxicité est faible ou nulle, des niveaux de concentrations espacés d'un facteur de 2 à 3 environ conviendront généralement. En cas de cytotoxicité, les concentrations d'essai retenues doivent couvrir une plage englobant la concentration produisant une cytotoxicité telle que décrite au paragraphe 22 et les concentrations pour lesquelles une cytotoxicité modérée, faible ou nulle est observée. De nombreux produits chimiques d'essai présentent des courbes concentration-réponse à forte

▼M7

pente et, pour obtenir des données dans le cadre d'une cytotoxicité faible et modérée ou étudier la relation dose-réponse en détail, il faudra donc utiliser des concentrations plus rapprochées et/ou plus de trois concentrations (cultures uniques ou répliques), notamment dans les cas où il est nécessaire de répéter l'expérience (voir paragraphe 47).

Si la concentration maximale est basée sur la cytotoxicité, la concentration la plus forte doit viser une cytotoxicité de 55 ± 5 % selon les paramètres de cytotoxicité recommandés (à savoir une réduction de la RICC et du RPD pour les lignées cellulaires et une réduction du MI pour les cultures primaires de lymphocytes à 45 ± 5 % du témoin négatif concomitant). Les résultats positifs présents uniquement dans la tranche la plus haute de la plage de cytotoxicité 55 ± 5 % doivent être interprétés avec prudence (13).

Pour les produits chimiques d'essai peu solubles qui ne sont pas cytotoxiques à des concentrations inférieures à la concentration insoluble la plus faible, la plus forte concentration analysée doit produire une turbidité ou un précipité visible à l'œil nu ou à l'aide d'un microscope inversé à la fin du traitement avec le produit chimique d'essai. Même si une cytotoxicité intervient au-delà de la concentration insoluble la plus faible, il est recommandé de tester une seule concentration produisant une turbidité ou un précipité visible, car de fausses réponses pourraient découler de ce précipité. À la concentration produisant un précipité, il convient de s'assurer que ce dernier n'interfère pas avec la conduite de l'essai (coloration ou analyse, par exemple). Il peut être utile de déterminer la solubilité dans le milieu de culture préalablement à l'essai.

Si aucun précipité ou aucune cytotoxicité limitante ne sont observés, la concentration d'essai maximale doit correspondre à la plus basse parmi 10 mM, 2 mg/ml ou 2 µl/ml (39) (40) (41). Lorsque la composition du produit chimique d'essai n'est pas définie, par exemple dans le cas d'une substance de composition inconnue ou variable, de produits de réaction complexes ou de matériels biologiques (UVCB) (42), de produits extraits de l'environnement etc., il peut être nécessaire d'augmenter la la concentration maximale (5 mg/ml par exemple), en absence de cytotoxicity suffisante, afin d'accroître la concentration de chacun des composants. Il convient toutefois de noter que ces exigences peuvent être différentes pour les produits pharmaceutiques à usage humain (43).

Témoins

Des témoins négatifs concomitants (voir paragraphe 15), constitués uniquement du solvant dans le milieu de traitement et testés de la même façon que les cultures traitées, doivent être inclus pour chaque moment de récolte.

Des témoins positifs concomitants sont nécessaires pour démontrer la capacité du laboratoire à identifier les clastogènes dans les conditions du protocole d'essai utilisé, ainsi que l'efficacité du système d'activation métabolique exogène, le cas échéant. Le tableau 1 ci-dessous présente des exemples de témoins positifs. D'autres produits chimiques peuvent être utilisés comme témoins positifs, si cela est justifié. Étant donné que les essais *in vitro* de génotoxicité sur cellules de mammifères sont suffisamment normalisés, l'utilisation de témoins positifs peut être limitée à un clastogène nécessitant une activation métabolique. À condition qu'elle soit réalisée simultanément à l'essai non activé et sur la même durée de traitement, cette réponse de témoin positif unique démontrera à la fois l'activité du système d'activation métabolique et la réactivité du système d'essai. Un traitement de longue durée (sans S9) doit toutefois disposer de son propre témoin positif, étant donné que la durée du traitement sera différente de celle de l'essai ayant recours à une activation métabolique. Chaque témoin positif doit être utilisé à une ou plusieurs concentrations devant normalement donner lieu à une augmentation reproductible et détectable par rapport à la valeur de fond afin de démontrer la sensibilité du système d'essai (c'est-à-dire que les effets sont nets mais que l'identité des lames codées n'est pas évidente pour l'examinateur) et la réponse ne doit pas être compromise par une cytotoxicité supérieure aux limites fixées dans la présente méthode d'essai.

▼M7

Tableau 1

Produits chimiques de référence recommandés pour la vérification des compétences du laboratoire et pour la sélection des témoins positifs

Catégorie	Produit chimique	Numéro CAS
1. Clastogènes actifs sans activation métabolique		
	Méthanesulfonate de méthyle	66-27-3
	Mitomycine C	50-07-7
	Oxyde de nitro-4-quinoléine	56-57-5
	Cytosine-arabinoside	147-94-4
2. Clastogènes nécessitant une activation métabolique		
	Benzo(a)pyrène	50-32-8
	Cyclophosphamide	50-18-0

MODE OPÉRATOIRE

Traitement avec le produit chimique d'essai

Les cellules en prolifération sont traitées avec le produit chimique d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique.

Délai de récolte des cultures

Pour une évaluation complète, laquelle serait nécessaire pour conclure à un résultat négatif, les trois conditions expérimentales suivantes doivent être respectées pour un traitement de courte durée avec et sans activation métabolique, et pour un traitement de longue durée sans activation métabolique (voir paragraphes 43, 44 et 45):

— Les cellules sont exposées au produit chimique d'essai sans activation métabolique pendant 3 à 6 heures puis sont prélevées à l'issue d'une période équivalente à environ 1,5 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement (18).

— Les cellules sont exposées au produit chimique d'essai avec activation métabolique pendant 3 à 6 heures, puis sont prélevées à l'issue d'une période équivalente à environ 1,5 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement (18).

— Les cellules sont exposées en continu sans activation métabolique jusqu'au moment du prélèvement à l'issue d'une période équivalente à environ 1,5 fois le cycle cellulaire normal. Certains produits chimiques (analogues de nucléosides, par exemple) peuvent être détectés plus facilement en prolongeant le temps de traitement et de prélèvement au-delà de 1,5 fois la durée normale du cycle cellulaire (24).

Si l'une de ces conditions expérimentales entraîne une réponse positive, il n'est pas forcément nécessaire d'étudier les autres régimes de traitement.

Préparation des chromosomes

Les cultures de cellules sont traitées au colcemide ou à la colchicine pendant une période de une à trois heures avant la récolte. Chaque culture est récoltée et traitée séparément en vue de la préparation des chromosomes. La préparation des chromosomes passe par un traitement hypotonique des cellules, leur fixation et leur coloration. Il est possible que les cultures monocouches présentent des cellules mitotiques (reconnaissables à leur forme ronde et se détachant de la

▼M7

surface) à l'issue du traitement de 3 à 6 heures. Ces cellules se détachant facilement de la culture, elles risquent d'être emportées lors de l'élimination du milieu contenant le produit chimique d'essai. Si l'on constate une augmentation substantielle du nombre de cellules mitotiques par rapport aux témoins, ce qui indiquerait l'arrêt probable de la mitose, les cellules doivent être récoltées par centrifugation puis réintroduites dans les cultures afin d'éviter de perdre les cellules en phase de mitose, et présentant un risque d'aberration chromosomique, au moment de la récolte.

Analyse

Toutes les lames, y compris celles des témoins positifs et négatifs, doivent être codées individuellement avant l'analyse au microscope pour déceler les aberrations chromosomiques. Le procédé de fixation provoquant souvent la perte de chromosomes pour une certaine fraction des cellules en métaphase, les cellules examinées doivent donc contenir un nombre de centromères égal au nombre modal ± 2.

Il y a lieu d'examiner au moins 300 cellules en métaphase bien étalées par concentration et par témoin pour conclure qu'un produit chimique d'essai est clairement négatif (voir paragraphe 45). Les 300 cellules doivent être réparties équitablement entre les répliques, lorsque les cultures ont été réalisées en plusieurs exemplaires. Lorsque des cultures en un seul exemplaire sont utilisées pour chaque concentration (voir paragraphe 21), il y a lieu d'examiner au moins 300 cellules en métaphase bien étalées par culture. L'examen de 300 cellules présente l'avantage d'augmenter la puissance statistique de l'essai. En outre, il est rare d'observer des valeurs nulles (de l'ordre de 5 % seulement) (44). Le nombre de métaphases examinées peut être réduit lorsqu'un grand nombre de cellules présentant des aberrations chromosomiques est observé et s'il a été conclu que le produit chimique d'essai est clairement positif.

Les cellules présentant une/des aberration(s) chromosomique(s) structurale(s), lacunes comprises et non comprises, doivent être examinées. Les cassures et les lacunes sont définies à l'appendice 1 conformément à (45) (46). Il convient de consigner séparément les aberrations chromatidiques et chromosomiques et de les classer par sous-catégories (cassures, échanges). Les procédures en cours dans le laboratoire doivent assurer que l'analyse des aberrations chromosomiques est réalisée par des examinateurs qualifiés sous le contrôle de pairs si nécessaire.

Bien que l'essai soit destiné à détecter les aberrations chromosomiques structurales, il est important de rapporter la fréquence des cas de polyploïdie et d'endoreduplication lorsqu'ils se présentent. (Voir paragraphe 2.)

Compétence du laboratoire

Afin d'établir qu'il possède une expérience suffisante pour mener à bien l'essai avant de l'utiliser en routine, le laboratoire doit avoir réalisé une série d'expériences avec des produits chimiques positifs de référence agissant selon des mécanismes variés, et avec plusieurs témoins négatifs (faisant appel à différents solvants/véhicules). Ces réponses de témoins positifs et négatifs doivent être cohérentes par rapport à la littérature. Cette exigence ne s'applique pas aux laboratoires possédant déjà une expérience, c'est-à-dire qui disposent une base de données historiques telle que définie au paragraphe 37.

Une sélection de produits chimiques utilisés comme témoins positifs (voir tableau 1, paragraphe 26) doit être testée dans le cadre de traitements de courte et de longue durée en l'absence d'activation métabolique, ainsi que dans le cadre d'un traitement de courte durée en présence d'une activation métabolique, l'objectif étant de démontrer que le laboratoire possède la compétence nécessaire pour détecter les produits chimiques clastogènes et pour déterminer l'efficacité du système d'activation métabolique. Il conviendra de définir une plage de concentrations des produits chimiques sélectionnés qui permette d'obtenir des augmentations reproductibles et liées à la concentration par rapport aux valeurs de fond, afin de démontrer la sensibilité et la plage dynamique du système d'essai.

▼M7

Données des témoins historiques

Le laboratoire doit établir:

— une plage et une distribution des témoins positifs historiques,

— une plage et une distribution des témoins négatifs (non traités, de solvant) historiques.

Lors de l'acquisition initiale de données en vue d'établir une distribution des témoins négatifs historiques, les données des témoins négatifs concomitants doivent être cohérentes avec les données publiées, lorsqu'elles existent. Puis, à mesure que de nouvelles données expérimentales viennent étoffer la plage de distribution des témoins, les données des témoins négatifs concomitants doivent idéalement se situer dans les limites de contrôle 95 % de cette distribution (44) (47). La base de données historiques du laboratoire relatives aux témoins négatifs doit à l'origine être constituée à partir d'au moins 10 expériences, sachant qu'il serait préférable qu'elle en compte au moins 20, réalisées dans des conditions expérimentales similaires. Les laboratoires doivent avoir recours à des méthodes de contrôle de la qualité telles que des graphiques statistiques (cartes C ou cartes X-barre, par exemple (48)), afin de déterminer la variabilité de leurs données de témoins positifs et négatifs et de démontrer leur maîtrise de la méthodologie (44). On trouve dans la littérature (47) d'autres recommandations sur la façon de constituer et d'utiliser ces données historiques (critères d'inclusion et d'exclusion des données dans la base et critères d'acceptabilité pour une expérimentation donnée).

Toute modification du protocole expérimental doit être étudiée en termes de cohérence avec les bases de données des témoins historiques existantes du laboratoire. Toute incohérence majeure doit conduire à l'établissement d'une nouvelle base de données des témoins historiques.

Les données des témoins négatifs désignent l'incidence des cellules présentant des aberrations chromosomiques issues d'une seule culture ou de l'ensemble des cultures réalisées en plusieurs exemplaires, comme décrit au paragraphe 21. Les témoins négatifs concomitants se situent idéalement dans les limites de contrôle à 95 % de la distribution des données historiques des témoins négatifs contenues dans la base de données du laboratoire (44) (47). Lorsque les données des témoins négatifs concomitants se situent en dehors des limites de contrôle à 95 %, leur inclusion dans la distribution des témoins historiques peut être acceptable, à condition que ces données ne soient pas exagérément extrêmes et qu'il soit prouvé que le système d'essai est «sous contrôle» (voir paragraphe 37) et qu'il n'y a pas eu de défaillance technique ou humaine.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Présentation des résultats

Le pourcentage de cellules présentant une/des aberration(s) structurale(s) doit être évalué. Les aberrations chromatidiques et chromosomiques classées par sous-catégorie (cassure, échange) doivent être consignées séparément, avec leur nombre et leur fréquence pour les cultures traitées et les cultures témoins. Les lacunes sont enregistrées et rapportées séparément, mais elles ne sont pas incluses dans la fréquence totale des aberrations. Le pourcentage de cellules polyploïdes et/ou endoredupliquées est rapporté le cas échéant.

Il convient aussi d'effectuer des mesures parallèles de cytotoxicité et de les consigner pour toutes les cultures traitées et les témoins négatifs et positifs dans la ou les expériences principales sur les aberrations.

Les données doivent être indiquées individuellement pour chaque culture. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux.

Critères d'acceptabilité

L'acceptation de l'essai repose sur les critères suivants:

— Les données relatives aux témoins négatifs concomitants sont considérées comme pouvant être ajoutées à la base de données des témoins négatifs historiques du laboratoire (voir paragraphe 39).

▼M7

— Les témoins positifs concomitants (voir paragraphe 26) doivent induire des réponses compatibles avec celles générées dans la base de données des témoins positifs historiques et produire une augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins négatifs concomitants.

— Les critères de prolifération cellulaire dans le témoin de solvant doivent être remplis (paragraphes 17 et 18).

— Les trois conditions expérimentales ont été testées, à moins que l'une d'entre elles ait abouti à des résultats positifs (voir paragraphe 28).

— Un nombre adéquat de cellules et de concentrations sont analysables (paragraphes 31 et 21).

— Les critères de sélection de la concentration maximale sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 22, 23 et 24.

Évaluation et interprétation des résultats

À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si, dans les conditions expérimentales étudiées (voir paragraphe 28):

a) au moins une des concentrations d'essai présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant,

b) un test de tendance approprié montre que l'augmentation est liée à la dose,

c) des résultats se situent à l'extérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson, par exemple; voir paragraphe 39).

Lorsque tous ces critères sont remplis, le produit chimique d'essai est considéré comme capable d'induire des aberrations chromosomiques dans les cellules de mammifères en culture dans ce système d'essai. Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont également disponibles dans la littérature (49) (50) (51).

À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si, dans toutes les conditions expérimentales étudiées (voir paragraphe 28):

a) aucune concentration d'essai ne présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant,

b) un test de tendance approprié montre qu'il n'y a pas d'augmentation liée à la concentration,

c) l'intégralité des résultats se situe à l'intérieur de la distribution des données des témoins négatifs historiques (limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson, par exemple; voir paragraphe 39).

Le produit chimique d'essai est alors considéré comme incapable d'induire des aberrations chromosomiques dans les cellules de mammifères en culture dans ce système d'essai.

Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse clairement positive ou négative.

Lorsque la réponse n'est ni clairement négative ni clairement positive, tel que décrit ci-dessus, ou afin d'établir la signification biologique d'un résultat, les données doivent être soumises à un jugement d'experts et/ou des investigations plus poussées. Il peut être utile d'examiner des cellules supplémentaires (le cas échéant) ou de répéter l'expérience, éventuellement dans des conditions expérimentales modifiées [espacement des concentrations, autres conditions d'activation métabolique (concentration de S9 ou origine de S9), par exemple].

Dans de rares cas, même après des études complémentaires, l'ensemble de données ne permettra pas de conclure à un résultat positif ou négatif. Dans ce cas, la réponse au produit chimique d'essai sera considérée comme équivoque.

▼M7

Une augmentation du nombre de cellules polyploïdes peut signifier que le produit chimique d'essai est capable d'inhiber les processus mitotiques et d'induire des aberrations chromosomiques numériques (52). Une augmentation du nombre de cellules présentant des chromosomes endoredupliqués peut indiquer que le produit chimique d'essai est capable d'inhiber la progression du cycle cellulaire (53) (54) (voir paragraphe 2). La fréquence des cellules polyploïdes et des cellules présentant des chromosomes endoredupliqués doit donc être consignée séparément.

Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes:

Produit chimique d'essai:

— source, numero de lot, date limite d'utilisation, si c'est disponible

— stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue;

— solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant, si elles sont connues;

— mesure du pH, de l'osmolalité et de la précipitation dans le milieu de culture auquel le produit chimique d'essai a été ajouté, le cas échéant.

Substance mono-constituant

— apparence physique, hydro-solubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude

— identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges:

— caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants

Solvant

— justification du choix du solvant;

— le pourcentage de solvant présent dans le milieu de culture final devrait aussi être indiqué.

Cellules:

— type et source des cellules utilisées;

— données sur le caryotype et raisons du choix du type de cellule utilisé;

— absence de mycoplasmes, pour les lignées cellulaires;

— pour les lignées cellulaires, informations sur la durée du cycle cellulaire, le temps de doublement ou l'indice de prolifération;

— sexe, âge et toute autre information pertinente sur les donneurs de sang, sang complet ou lymphocytes isolés, mitogène employé;

— nombre de passages, le cas échéant, pour les lignées cellulaires;

— méthodes d'entretien des cultures, pour les lignées cellulaires;

— nombre modal de chromosomes, pour les lignées cellulaires.

▼**M7**

Conditions de l'essai:

— identité de l'agent de blocage de métaphase, sa concentration et la durée de contact;

— concentration du produit chimique d'essai sous la forme de sa concentration finale dans le milieu de culture (par exemple en µg ou mg/ml ou mM du milieu de culture);

— justification du choix des concentrations et du nombre de cultures, y compris données concernant la cytotoxicité et les limites de solubilité, par exemple;

— composition du milieu, concentration de CO_2 le cas échéant, degré d'humidité;

— concentration (et/ou volume) de solvant et de produit chimique d'essai ajoutée au milieu de culture;

— température d'incubation;

— temps d'incubation;

— durée du traitement;

— délai de récolte après traitement;

— densité cellulaire au moment de l'ensemencement, le cas échéant;

— type et composition du système d'activation métabolique (source du S9, méthode de préparation du mélange S9, concentration ou volume de mélange S9 et de S9 dans le milieu de culture final, contrôles de la qualité du S9);

— produits chimiques témoins positifs et négatifs, concentrations finales pour chacune des conditions de traitement;

— méthodes de préparation des lames et technique de coloration utilisées;

— critères d'acceptabilité des essais;

— critères utilisés pour examiner les aberrations;

— nombre de métaphases analysées;

— méthodes de mesure de la cytotoxicité;

— toute information supplémentaire concernant la cytotoxicité et la méthode utilisée;

— critères pour conclure que l'étude est positive, négative ou équivoque;

— méthodes utilisées pour déterminer le pH, l'osmolalité et la précipitation.

Résultats:

— nombre de cellules exposées et nombre de cellules récoltées pour chaque culture en cas de lignées cellulaires;

— mesures de la cytotoxicité, par exemple RPD, RICC, MI, autres observations le cas échéant;

— informations sur la durée du cycle cellulaire, le temps de doublement ou l'indice de prolifération en cas de lignées cellulaires;

— signes de précipitation et moment de la détermination;

▼**M7**

— définition appliquée aux aberrations, y compris aux lacunes;

— nombre de cellules examinées, nombre de cellules présentant des aberrations et types d'aberration, donnés séparément pour chaque culture traitée et témoin, incluant et excluant les lacunes;

— modifications de la ploïdie (cellules polyploïdes et cellules présentant des chromosomes endoreduplicués, indiquées séparément) le cas échéant;

— relation concentration-réponse, si possible;

— données relatives aux témoins négatifs (solvant) et positifs (concentrations et solvants) concomitants;

— données relatives aux témoins négatifs (solvant) et positifs historiques, y compris ordres de grandeur, moyennes, écarts-types, limites de contrôle à 95 % pour la distribution, et nombre de données;

— analyse statistique; valeurs P le cas échéant.

Discussion des résultats.

Conclusions.

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (2016), «Overview of the set of OECD Genetic Toxicity Test Guidelines and updates performed in 2014-2015». Publications ENV. Série sur les essais et l'évaluation n° 234, OCDE, Paris.

(2) Evans, H.J. (1976), «Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens», in *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.

(3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), «The in Vitro Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture» in *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. et al. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York- Oxford, pp. 427-432.

(4) Galloway, S.M. et al. (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

(5) Muehlbauer, P.A. et al. (2008), «Improving dose selection and identification of aneugens in the in vitro chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods», *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, pp. 318-327.

(6) Chapitre B.49 de la présente annexe*: Test du micronoyau in vitro sur cellules de mammifères*.

(7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.

(8) Scott, D. et al. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol.257/2, pp. 147-204.

(9) Morita, T. et al. (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, pp. 297-305.

(10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagen*esis, Vol. 8/6, pp. 789-886.

▼M7

(11) Long, L.H. et al. (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* Vol. 634/1-2, pp. 177-183.

(12) Nesslany, F. et al. (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, pp. 439-452.

(13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 191-201.

(14) Kirkland, D. et al. (2005), Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 584/1-2, pp. 1–256.

(15) Greenwood, S. et al. (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the in vitro assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, pp. 36–44.

(16) Hilliard, C.A. et al. (1998), Chromosome aberrations in vitro related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, pp. 316–326.

(17) Hedner K. et al. (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, Vol. 62, pp. 305-309.

(18) Ramsey M.J. et al. (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, Vol. 338, pp. 95-106.

(19) Coecke S. et al. (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, pp. 261-287.

(20) Henderson, L. et al. (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol.12/3, pp.163-167.

(21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, pp. 347-363.

(22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.

(23) Natarajan, A.T. et al. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res*earch, Vol. 37/1, pp. 83-90.

(24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix in vitro, *Mutation Research/ Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, pp. 277-290.

(25) Ong, T.-m. et al. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, pp. 55-65.

(26) Elliot, B.M. et al. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in in Vitro Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, pp. 175-177.

▼M7

(27) Matsushima, T. et al. (1976), «A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems», in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. et al. (eds.), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(28) Galloway, S.M. et al. (1994). Report from Working Group on in Vitro Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 241-261.

(29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28/1, pp. 51-59.

(30) PNUE (2001), Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants, Programme des Nations unies pour l'environnement (PNUE). Disponible à l'adresse: http://www.pops.int/.

(31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 190/3, pp. 225-8.

(32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), «CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids», in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.

(33) Zamora, P.O. et al. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.

(34) Asakura, M. et al. (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.

(35) Lorge, E. et al. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* Vol. 655/1-2, pp. 1-3.

(36) Galloway, S. et al. (2011), Workshop summary: Top concentration for in vitro mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for in vitro cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 77-83.

(37) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 724/1-2, pp. 86-87.

(38) Richardson, C. et al. (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(39) OCDE (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) ENV/JM/TG(2014)17. Disponible sur demande.

(40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the in vitro chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1-2, pp. 32-56.

(41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Muagenesis,* Vol. 54/1, pp. 36-43.

▼**M7**

(42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Disponible à l'adresse: https://federalregister.gov/a/2012-13774.

(44) OCDE (2014), «Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE», Série sur les essais et l'évaluation, n° 198, OCDE, Paris.

(45) ISCN (2013), An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.

(46) Scott, D. et al. (1990), «Metaphase chromosome aberration assays in vitro», in *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 62-86.

(47) Hayashi, M. et al. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.

(49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.

(50) Galloway, S.M. et al. (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

(51) Richardson, C. et al. (1989), «Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays», in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two in vitro mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 29-46.

(53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, Vol. 119/3, pp. 403-413.

(54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin — induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, Vol. 43/3, pp. 1362-1364.

(55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Res*earch, Vol. 312, pp. 139-149.

▼M7

Appendice 1

DÉFINITIONS

Aberration de type chromatidique: lésion chromosomique structurale se traduisant par une cassure d'une seule chromatide ou par une cassure et une réunion entre chromatides.

Aberration de type chromosomique: lésion chromosomique structurale se traduisant par une cassure, ou par une cassure et une réunion, des deux chromatides sur un même site.

Aberration numérique: modification du nombre de chromosomes par rapport au nombre normal caractéristique des cellules employées.

Aberration structurale: modification de la structure des chromosomes, détectable par un examen au microscope des cellules au stade de la métaphase et apparaissant sous la forme de délétions, fragmentations et modifications intra-chromosomiques ou interchromosomiques.

Aneuploïdie: tout écart par rapport au nombre diploïde (ou haploïde) normal de chromosomes, d'un seul ou de plusieurs chromosomes, mais non d'un ou de plusieurs jeux de chromosomes (polyploïdie).

Apoptose: mort cellulaire programmée caractérisée par une succession d'étapes menant à la désintégration des cellules en particules membranaires qui sont ensuite éliminées par phagocytose ou par excrétion.

Augmentation relative du nombre de cellules (Relative increase in cell count, RICC): augmentation du nombre de cellules dans les cultures exposées à un produit chimique par rapport aux cultures non traitées. Ratio exprimé en pourcentage.

Cassure de chromatide: interruption de la continuité d'une chromatide, manifestée par un défaut d'alignement clair de l'une des chromatides.

Clastogène: produit chimique induisant des aberrations chromosomiques structurales dans des populations cellulaires ou des organismes eucaryotes.

Concentrations: désigne les concentrations finales du produit chimique d'essai dans le milieu de culture.

Cytotoxicité: pour les essais visés par la présente méthode d'essai et utilisant des lignées cellulaires, la cytotoxicité correspond à une baisse du doublement relatif de la population (RPD) ou de l'augmentation relative du nombre de cellules (RICC) des cellules traitées par rapport au témoin négatif (voir paragraphe 17 et appendice 2). Pour les essais visés par la présente méthode d'essai et utilisant des cultures primaires de lymphocytes, la cytotoxicité correspond à une baisse de l'indice mitotique (MI) des cellules exposées par rapport au témoin négatif (voir paragraphe 18 et appendice 2).

Doublement relatif de la population (Relative Population Doubling, RPD): augmentation du nombre de doublements de population dans les cultures exposées à un produit chimique par rapport aux cultures non traitées. Ratio exprimé en pourcentage.

Endoreduplication: processus selon lequel le noyau, après une période S de réplication de l'ADN, n'entre pas en mitose mais recommence une nouvelle période S. Il en résulte des chromosomes comptant 4, 8, 16,… chromatides.

Fraction S9 de foie: surnageant d'homogénat de foie centrifugé à 9 000 g (extrait de foie cru).

Génotoxique: terme générique qualifiant tous les types de lésions de l'ADN ou des chromosomes, tels que les cassures, délétions, adduits, liaisons et modifications des nucléotides, réarrangements, mutations génétiques, aberrations chromosomiques et aneuploïdies. Tous les types d'effets génotoxiques n'entraînent pas nécessairement de mutations ou de lésions chromosomiques stables.

Indice mitotique (*Mitotic Index*, MI): nombre de cellules en métaphase divisé par le nombre total de cellules dans une population; une indication de la vitesse de prolifération.

▼M7

Lacune chromatidique: région non colorée (lésion achromatique) d'une seule chromatide pour laquelle on observe un défaut d'alignement minime de la chromatide.

Mélange S9: mélange de fraction S9 de foie et de cofacteurs nécessaires à l'activité des enzymes métaboliques.

Mitose: division du noyau cellulaire, généralement décomposée en prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase.

Mutagène: qui produit une modification héréditaire portant sur une ou plusieurs séquences de paires de bases d'ADN génique, ou sur la structure de chromosomes (aberrations chromosomiques).

Polyploïdie: aberrations chromosomiques numériques dans des cellules ou des organismes, impliquant un ou plusieurs jeux de chromosomes et non un ou plusieurs chromosomes isolés (aneuploïdie).

Prolifération cellulaire: augmentation du nombre de cellules résultant de la division cellulaire mitotique.

Statut p53: la protéine p53 intervient dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation de l'ADN. Les cellules déficientes en protéine p53 fonctionnelle, incapables d'arrêter le cycle cellulaire ou d'éliminer les cellules lésées par le biais de l'apoptose ou d'autres mécanismes (induction de la réparation de l'ADN, par exemple) liés aux fonctions de p53 en réponse à des lésions de l'ADN, devraient théoriquement être davantage sujettes aux mutations génétiques ou aux aberrations chromosomiques.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Témoin de solvant: terme générique désignant les cultures témoins recevant uniquement le solvant utilisé pour dissoudre le produit chimique d'essai.

Témoins non traités: cultures ne recevant aucun traitement (ni produit chimique d'essai ni solvant) mais préparées parallèlement et de la même façon que les cultures exposées au produit chimique d'essai.

▼M7

Appendice 2

FORMULES POUR L'ÉVALUATION DE LA CYTOTOXICITÉ

Indice mitotique (MI):

$$\mathbf{MI}(\%) = \frac{\text{Nombre de cellules mitotiques}}{\text{Nombre total de cellules examinées}} \times 100$$

L'augmentation relative du nombre de cellules (RICC) et le **doublement relatif de la population (RPD)** sont des mesures recommandées, qui tiennent compte de la proportion de cellules ayant effectué une division cellulaire.

$$\mathbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{Augmentation du nombre de cellules dans les cultures traitées}(\text{final} - \text{initial}))}{(\text{Augmentation du nombre de cellules dans les cultures témoins}(\text{final} - \text{initial}))} \times 100$$

$$\mathbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{Nombre de doublements de population dans les cultures traitées})}{(\text{Nombre de doublements de population dans les cultures témoins})} \times 100$$

où:

Doublement de population = [log (nombre de cellules post-application ÷ nombre de cellules initial)] ÷ log 2

Par exemple, une RICC ou un RPD de 53 % indique une cytotoxicité/cytostase de 47 % et une cytotoxicité/cytostase de 55 % mesurée par le MI signifie que le MI réel représente 45 % du témoin.

Quoi qu'il en soit, il convient de mesurer le nombre de cellules avant traitement, qui doit être identique dans les cultures traitées et les cultures témoins négatives.

Le RCC (à savoir le ratio nombre de cellules dans les cultures traitées / nombre de cellules dans les cultures témoins) était utilisé auparavant comme paramètre de cytotoxicité, mais n'est plus recommandé car il peut induire une sous-estimation de la cytotoxicité.

Dans les cultures témoins négatives, le doublement de la population doit être compatible avec l'obligation de prélever des cellules à l'issue d'une période équivalente à environ 1.5 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement, et l'indice mitotique doit être assez élevé pour obtenir un nombre suffisant de cellules en mitose et calculer de façon fiable une réduction de 50 %.

▼M7

B.11. ESSAI D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE SUR MOELLE OSSEUSE DE MAMMIFÈRES

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 475 (2016) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Elle s'inscrit dans une série de méthodes d'essai sur la toxicologie génétique. Par ailleurs, un document de l'OCDE qui fournit des informations succintes sur les essais de génotoxicité et donne une vue d'ensemble des modifications récemment apportées à ces lignes directrices a été élaboré (1).

L'essai d'aberration chromosomique in vivo sur moelle osseuse de mammifères se prête particulièrement bien à l'évaluation de la génotoxicité car, malgré des variations entre les espèces, les facteurs du métabolisme in vivo, la pharmacocinétique et les processus de réparation de l'ADN sont actifs et contribuent aux réponses. L'essai in vivo est également considéré comme utile pour explorer plus avant un effet génotoxique détecté dans un système in vitro.

L'essai d'aberration chromosomique in vivo est destiné à identifier les produits chimiques d'essai qui provoquent des aberrations chromosomiques structurales dans des cellules de moelle osseuse d'animaux, généralement des rongeurs (2) (3) (4) (5). Les aberrations structurales peuvent être de deux types: chromosomiques ou chromatidiques. Si la majorité des aberrations induites par des produits chimiques génotoxiques sont de type chromatidique, des aberrations chromosomiques se produisent aussi. Les lésions chromosomiques et les événements connexes sont à l'origine de beaucoup de maladies génétiques humaines et on a de bonnes raisons de penser que, lorsque ces lésions et événements connexes frappent des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs, ils jouent un rôle dans le cancer chez l'homme et dans les systèmes expérimentaux. Il est possible que des cas de polyploïdie (y compris d'endoreduplication) surviennent dans les essais d'aberration chromosomique in vivo. Or, une augmentation de la polyploïdie n'est n'indique pas en soi le signe d'un potentiel aneugène et peut simplement indiquer une perturbation du cycle cellulaire ou une cytotoxicité. Cet essai n'est pas conçu pour mesurer l'aneuploïdie. Pour détecter l'aneuploïdie, il est recommandé de réaliser un test du micronoyau in vivo sur érythrocytes de mammifère (chapitre B.12 de la présente annexe) ou un test du micronoyau in vitro sur cellules de mammifères (chapitre B.49 de la présente annexe).

Les définitions utilisées sont données à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

Les rongeurs sont couramment utilisés dans cet essai, mais dans certains cas, d'autres espèces peuvent convenir si cela est justifié sur le plan scientifique. Cet essai se pratique sur la moelle osseuse, qui est un tissu très vascularisé formé d'une population de cellules au cycle rapide et faciles à prélever et à traiter. L'utilisation d'une espèce autre que le rat ou la souris doit être scientifiquement justifiée dans le rapport. Si des animaux autres que des rongeurs sont utilisés, il est recommandé que la mesure des aberrations chromosomiques sur la moelle osseuse soit intégrée à un autre essai de toxicité pertinent.

Cet essai n'est pas pertinent s'il est prouvé que les substances chimiques d'essai, ou leurs métabolites, n'atteindront pas le tissu cible.

Avant d'utiliser la méthode d'essai sur un mélange pour générer des données avec pour objectif recherché l'application réglementaire, on examinera si, et si oui, pourquoi, elle peut fournir des résultats adéquats à cette fin. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé.

▼M7

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Les animaux sont exposés au produit chimique d'essai par une voie d'exposition idoine et sont euthanasiés au moment approprié après le traitement. Avant l'euthanasie, les animaux sont traités avec un inhibiteur du fuseau (par exemple la colchicine ou le colcemide). Ensuite, les préparations chromosomiques faites à partir de cellules de la moelle osseuse sont colorées et les cellules en métaphase sont examinées pour mettre en évidence les aberrations chromosomiques.

VÉRIFICATION DES COMPÉTENCES DU LABORATOIRE

Épreuves de compétence

Afin d'établir qu'il possède une expérience suffisante pour mener à bien l'essai avant de l'utiliser en routine, le laboratoire doit démontrer sa capacité à reproduire les résultats attendus d'après les données publiées ((6), par exemple) concernant les fréquences d'aberrations chromosomiques, avec un minimum de deux substances chimiques témoins positifs (y compris des réponses faibles induites par des doses faibles de témoins positifs) tels que ceux énumérés au tableau 1 et avec des témoins de véhicule/solvant compatibles (voir paragraphe 22). Les doses utilisées dans le cadre de ces expériences doivent produire des augmentations reproductibles qui sont fonction de la dose administrée, et démontrer la sensibilité et la plage dynamique du système d'essai sur le tissu en question (moelle osseuse); la méthode d'analyse retenue doit être celle qui sera employée par le laboratoire. Cette exigence ne s'applique pas aux laboratoires possédant déjà une expérience, c'est-à-dire qui disposent d'une base de données historiques telle que définie aux paragraphes 10 à 14.

Données des témoins historiques

Dans le cadre de la vérification des compétences, le laboratoire devra établir:

— une plage et une distribution des témoins positifs historiques, et

— une plage et une distribution des témoins négatifs historiques.

Lors de l'acquisition initiale de données en vue d'établir une distribution des témoins négatifs historiques, les données des témoins négatifs concomitants doivent être cohérentes avec les données publiées, lorsqu'elles existent. Puis, à mesure que de nouvelles données expérimentales viennent étoffer la plage de distribution des témoins historiques, les données des témoins négatifs concomitants doivent idéalement se situer dans les limites de contrôle à 95 % de cette distribution. La base des données historiques du laboratoire relatives aux témoins négatifs doit être statistiquement robuste pour permettre au laboratoire d'évaluer la distribution de ses données des témoins négatifs. La littérature suggère qu'un minimum de 10 expériences peut-être nécessaire, sachant qu'il serait préférable d'en compter au moins 20, réalisées dans des conditions expérimentales similaires. Le laboratoire doit avoir recours à des méthodes de contrôle de la qualité telles que des graphiques statistiques (cartes C ou cartes X-barre, par exemple (7)), afin de déterminer la variabilité de ses données et de démontrer sa maîtrise de la méthodologie. On trouve dans la littérature (8) d'autres recommandations sur la façon de constituer et d'utiliser ces données historiques (critères d'inclusion et d'exclusion des données dans la base et critères d'acceptabilité pour une expérimentation donnée).

Si, au cours des expériences visant à vérifier sa compétence (comme décrit au paragraphe 9), le laboratoire n'a pas réalisé un nombre suffisant d'expériences pour établir une distribution des témoins négatifs statistiquement robuste (voir paragraphe 11), on peut accepter que la distribution soit construite au cours des premiers tests de routine. Cette approche devra suivre les recommandations établies dans la littérature (8) et les résultats des témoins négatifs obtenus lors de ces expériences devront être cohérents avec les données publiées des témoins négatifs.

▼M7

Toute modification du protocole expérimental doit être étudiée à la lumière de ses répercussions sur la cohérence des nouvelles données avec celles de la base de données des témoins historiques. Seules des incohérences majeures justifient l'établissement d'une nouvelle base de données des témoins historiques, après confirmation de la différence de distribution des données par des experts (voir paragraphe 11). Lors de la constitution de cette nouvelle base de données, le laboratoire n'a pas forcément besoin d'une base de données de témoins négatifs complète pour autoriser la conduite d'un essai, à condition qu'il puisse apporter la preuve que les valeurs des témoins négatifs concomitants sont cohérentes avec la précédente base de données ou avec les données publiées correspondantes.

Les données des témoins négatifs désignent l'incidence des aberrations chromosomiques structurales (lacunes non comprises) chez chaque animal. Les témoins négatifs concomitants se situent idéalement dans les limites de contrôle à 95 % de la distribution des données historiques des témoins négatifs contenues dans la base de données du laboratoire. Lorsque les données des témoins négatifs concomitants se situent en dehors des limites de contrôle à 95 %, leur inclusion dans la distribution des témoins historiques peut être acceptable, à condition que ces données ne soient pas exagérément extrêmes, et qu'il soit prouvé que le système d'essai est «sous contrôle» (voir paragraphe 11) et qu'il n'y a pas eu de défaillance technique ou humaine.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Préparations

Choix des espèces animales

Il convient d'employer de jeunes animaux adultes sains issus de souches de laboratoire courantes. Les rats sont habituellement utilisés, mais les souris peuvent également convenir. Toute autre espèce appropriée de mammifère peut être employée à condition qu'une justification scientifique de ce choix soit donnée dans le rapport.

Conditions d'encagement et d'alimentation des animaux

Pour les rongeurs, la température de l'animalerie doit être maintenue à 22°C (± 3°C). L'humidité relative, qui est idéalement de 50 à 60 %, doit atteindre au moins 40 % et de préférence ne pas dépasser 70 %, sauf durant le nettoyage du local. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire des animaux est le régime classique de laboratoire avec eau potable à volonté. Le choix des aliments peut être influencé par la nécessité d'assurer une bonne incorporation du produit chimique dans la nourriture si l'administration se fait par cette voie. Les rongeurs sont mis en cage par petits groupes d'individus de même sexe (cinq au maximum par cage) recevant le même traitement, si aucun comportement agressif n'est à craindre, de préférence dans des cages à fond plein dotées d'un enrichissement environnemental approprié. Les animaux peuvent être encagés individuellement si cela est justifié sur le plan scientifique.

Préparation des animaux

On choisit habituellement de jeunes animaux adultes sains (les rongeurs sont idéalement âgés de 6 à 10 semaines au début du traitement, bien que des animaux un peu plus âgés soient également acceptables), qui sont répartis de manière aléatoire entre les groupes témoins et les groupes de traitement. Chaque animal est identifié individuellement selon une méthode sans cruauté, la moins invasive possible (par exemple, baguage, étiquetage, pose d'une puce électronique ou identification biométrique, en évitant l'entaillage des oreilles ou la phalangectomie) et gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire. Les cages doivent être placées de manière à réduire au minimum l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats. Il convient d'éviter toute contamination croisée entre le témoin positif et le produit chimique d'essai. Au début de l'étude, la variation pondérale des animaux doit être minimale et ne pas dépasser ± 20 pour cent du poids moyen de chaque sexe.

Préparation des doses

Lorsque les produits chimiques testés sont solides, ils sont dissous ou mis en suspension dans des solvants ou des véhicules appropriés, ou incorporés aux aliments ou à l'eau de boisson avant d'être administrés aux animaux. Les produits

▼M7

chimiques liquides peuvent être administrés directement ou dilués avant d'être administrés. En cas d'exposition par inhalation, les produits chimiques d'essai peuvent être administrés sous forme de gaz, de vapeur ou d'aérosol solide ou liquide, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. On utilisera des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage et définissent les conditions de stockage appropriées.

Solvant/véhicule:

Le solvant/véhicule ne doit pas produire d'effets toxiques aux doses utilisées ni interagir avec les produits chimiques d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données de référence faisant état de leur compatibilité. Il est recommandé d'envisager en premier lieu l'utilisation d'un solvant/véhicule aqueux chaque fois que c'est possible. Parmi les exemples de solvants/véhicules compatibles couramment utilisés figurent notamment l'eau, le sérum physiologique, les solutions de méthylcellulose, les solutions de carboxyméthylcellulose sodique, l'huile d'olive et l'huile de maïs. En l'absence de données historiques ou publiées montrant que le véhicule/solvant inhabituel sélectionné n'induit aucune aberration structurale ou effet délétère, une étude initiale devra être réalisée afin d'établir l'acceptabilité du témoin de solvant/véhicule.

Témoins

Témoins positifs

Chaque essai doit normalement inclure un groupe d'animaux traités avec une substance chimique utilisée comme témoin positif. Cette étape peut être évitée une fois que le laboratoire d'essai a apporté la preuve de ses compétences pour la conduite de l'essai et établi la plage des témoins positifs historiques. Lorsqu'aucun groupe témoin concomitant n'est utilisé simultanément, des témoins d'examen (lames fixes et non colorées) devront être inclus dans chaque expérience. Pour ce faire, on pourra intégrer à l'étape d'examen des échantillons de référence idoines obtenus et stockés lors d'un essai séparé sur témoin positif mené périodiquement (par exemple, tous les 6 à 18 mois) dans le laboratoire dans lequel l'essai est conduit, notamment au cours de l'épreuve de compétence et par la suite sur une base régulière, si nécessaire.

Les susbtances utilisés comme témoins positifs doivent produire, de façon fiable, un accroissement détectable de la fréquence des cellules présentant des aberrations chromosomiques par rapport au niveau spontané. Les doses des témoins positifs doivent être choisies de telle sorte que les effets soient nets mais que l'identité des lames codées ne soit pas évidente pour l'examinateur. Il est possible d'administrer le témoin positif par une voie différente de celle du produit chimique d'essai, de suivre un autre programme de traitement et de n'effectuer qu'un seul prélèvement d'échantillon. De plus, l'emploi de témoins positifs appartenant à la même classe chimique peut être envisagé, s'il y a lieu. Des exemples de substances chimiques utilisées comme témoins positifs figurent au tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1

Exemples de substances chimiques utilisées comme témoins positifs

Substance chimique	N° CAS
Méthanesulfonate d'éthyle	62-50-0
Méthanesulfonate de méthyle	66-27-3
Ethylnitrosourée	759-73-9]
Mitomycine C	50-07-7]
Cyclophosphamide (monohydratée)	50-18-0 (6055-19-2)
Triéthylènemélamine	CAS 51-18-3

▼M7

Témoins négatifs

Pour chaque moment d'échantillonnage, il faut inclure un groupe d'animaux témoins négatifs, qui seront manipulés de la même façon que les groupes traités, mais ne recevront pas le produit chimique d'essai. Si un solvant/véhicule est utilisé pour administrer le produit chimique d'essai, ce solvant/véhicule doit être administré au groupe témoin. Toutefois, si des résultats obtenus antérieurement par le laboratoire d'essai démontrent que la variabilité interindividuelle et la fréquence des cellules comportant des aberrations chromosomiques provenant de témoins négatifs sont stables pour chaque moment d'échantillonnage, un seul prélèvement peut alors suffire pour les témoins négatifs. Dans ce cas, il doit intervenir au moment du premier prélèvement effectué dans le cadre de l'étude.

MODE OPÉRATOIRE

Nombre et sexe des animaux

En règle générale, la réponse des micronoyaux est similaire chez les animaux mâles et femelles (9), et il est à prévoir qu'il en sera de même pour les aberrations chromosomiques structurales; la plupart des études pourrait donc être réalisée sur l'un ou l'autre des deux sexes. Des données démontrant des différences significatives entre les mâles et les femelles (par exemple sur le plan de la toxicité systémique, du métabolisme, de la biodisponibilité, de toxicité sur la moelle osseuse, etc comprenant également des données provenant par exemple d'études de détermination des doses) encouragent l'utilisation des deux sexes. Il peut donc être plus approprié dans ce cas de mener une étude sur les deux sexes, par exemple dans le cadre d'une étude de toxicité à doses répétées. Il pourrait être judicieux de recourir à un plan factoriel en cas d'utilisation des deux sexes. Des précisions sur cette méthode d'analyse des données sont fournies à l'appendice 2.

La taille des groupes au début de l'étude doit permettre de disposer dans chaque groupe d'au moins cinq animaux analysables du même sexe, ou de chaque sexe si les deux sont utilisés. Si l'exposition humaine est spécifique pour un sexe, par exemple dans le cas de certains produits pharmaceutiques, l'essai sera pratiqué sur des animaux du sexe approprié. À titre d'information concernant le nombre maximum d'animaux généralement requis, une étude sur moelle osseuse comptant deux moments d'échantillonnage et impliquant trois groupes de traitement et un groupe de témoins négatifs concomitants, plus un groupe de témoins positifs (chaque groupe étant composé de cinq animaux du même sexe) nécessitera 45 animaux.

Niveaux de dose

Si l'on procède à une étude préliminaire de détermination des doses à administrer parce qu'on ne dispose pas de données fiables pour orienter le choix des doses, cette étude préliminaire doit être effectuée dans le même laboratoire, en utilisant une espèce, une souche, un sexe et un régime de traitement identiques à ceux de l'étude principale (10). Elle devra avoir pour objectif de déterminer la dose maximale tolérée (DMT), définie comme la dose la plus élevée qui sera tolérée sans faire apparaître de toxicité limitante, dans le cadre de la durée de l'étude (par exemple, induisant une baisse du poids corporel ou une cytotoxicité du système hématopoïétique), mais ne provoquant pas la mort ou des signes de douleur, de souffrance ou de détresse imposant de sacrifier les animaux (11).

La dose la plus élevée peut aussi être définie comme celle qui donne lieu à certains symptômes de toxicité pour la moelle osseuse.

Les substances chimiques dont les propriétés toxicocinétiques sont saturées ou qui induisent un processus de détoxification pouvant se traduire par une baisse de l'exposition après une administration à long terme peuvent faire exception aux critères d'établissement des doses et doivent être évaluées au cas par cas.

Pour permettre d'obtenir des informations sur la relation dose-réponse, une étude complète doit comporter un groupe témoin négatif et au moins trois niveaux de doses, espacés en général d'un facteur de 2, mais pas de plus de 4. Si le produit chimique d'essai ne provoque aucune toxicité dans le cadre d'une étude de détermination des doses, ou d'après les données disponibles, la dose la plus

▼M7

élevée pour une administration unique doit être de 2 000 mg/kg de poids corporel. Néanmoins, si le produit chimique d'essai provoque une toxicité, la dose administrée la plus élevée devra correspondre à la DMT et les niveaux de dose employés devront de préférence s'étendre de la dose maximale à une dose induisant peu ou pas de toxicité. Lorsqu'une toxicité sur le tissu cible (moelle osseuse) est observée à tous les niveaux de doses administrés, il est conseillé de procéder à des études complémentaires à des doses non toxiques. Les études visant à caractériser davantage les informations sur la relation quantitative dose-réponse peuvent nécessiter un ou plusieurs groupes de traitement supplémentaires. Enfin, ces limites peuvent varier pour certains types de produits chimiques d'essai (par exemple les produits pharmaceutiques à usage humain) faisant l'objet d'exigences spécifiques.

Essai limite

Si les essais préliminaires de détermination des doses ou les données existantes concernant des souches de rongeurs apparentées indiquent qu'un régime de traitement égal ou supérieur à la dose limite (décrite ci-dessous) n'engendre pas d'effets toxiques observables (notamment aucune dépression de la fonction médullaire osseuse ni autre cytotoxicité pour le tissu cible), et si la génotoxicité n'est pas escomptée d'après des études de génotoxicité in vitro ou d'après les données relatives aux substances structurellement apparentées, une étude complète utilisant trois niveaux de doses peut ne pas être considérée comme nécessaire, à condition qu'il ait été démontré que le/les produit(s) chimiques d'essai atteignent le tissu cible (moelle osseuse). Dans ce cas, un seul niveau de dose, égal à la dose limite, peut s'avérer suffisant. Pour une période d'administration de plus de 14 jours, la dose limite est de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour. Pour des périodes d'administration de 14 jours ou moins, la dose limite est de 2 000 mg/kg de poids corporel/jour.

Administration des doses

Lors de la conception d'un essai, il convient de tenir compte de la voie d'exposition humaine anticipée. Par conséquent, les voies d'administration telles que l'alimentation, l'eau de boisson, l'inhalation, l'implantation ainsi que les voies topique, sous-cutanée, intraveineuse, orale (par gavage) et intra-trachéale sont autant de choix valables, sous réserve qu'ils soient justifiés. Dans tous les cas, la voie retenue doit permettre une exposition adéquate du/des tissu(s) cible(s). L'injection intrapéritonéale n'est en général pas recommandée, car elle ne constitue pas une voie d'exposition humaine envisagée, et ne sera utilisée qu'en cas de justification scientifique spécifique. Si le produit chimique d'essai est mélangé à l'alimentation ou à l'eau de boisson, surtout dans le cas d'un dosage unique, il convient de s'assurer que le délai entre l'absorption de nourriture et d'eau et le prélèvement est suffisant pour permettre une détection des effets (voir paragraphes 33 et 34). Le volume maximal de liquide administrable en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne doit normalement pas excéder 1 ml/100 g de poids corporel, sauf pour les solutions aqueuses, où un maximum de 2 ml/100 g est acceptable. L'utilisation de volumes plus importants doit être justifiée. Il convient de réduire au minimum la variation du volume administré en ajustant la concentration à tous les niveaux de doses, afin de garantir l'administration d'un volume constant pour un poids corporel donné, sauf pour les produits irritants ou corrosifs dont les effets sont généralement exacerbés lorsqu'on augmente la concentration.

Programme de traitement

En règle générale, les produits chimiques d'essai sont administrés en une seule fois, mais si le volume est important, l'administration peut être fractionnée (à raison de deux traitements ou plus le même jour à intervalles de 2 à 3 heures maximum). En pareil cas, ou lors d'une administration du produit chimique d'essai par inhalation, le moment d'échantillonnage sera fixé en fonction du moment d'administration de la dernière fraction, ou de la fin de l'exposition.

On ne dispose guère de données sur la pertinence d'un protocole de doses répétées pour cet essai. Cependant, dans les cas où il est conseillé d'intégrer cet essai à un essai de toxicité à doses répétées, il faut prendre soin d'éviter la perte de cellules mitotiques présentant des lésions chromosomiques, un phénomène susceptible de se produire à des doses toxiques. Une telle intégration est

▼M7

acceptable lorsque la dose la plus élevée est supérieure ou égale à la dose limite (voir paragraphe 29) et que cette dose limite est administrée à un groupe de traitement pendant toute la durée du traitement. Il convient de considérer le test du micronoyau (méthode d'essai B.12) comme le test in vivo de première intention pour la détection des aberrations chromosomiques lorsqu'une intégration à d'autres études est souhaitée.

Les échantillons de moelle osseuse doivent être prélevés à deux moments différents à la suite de chaque traitement. Pour les rongeurs, le premier intervalle de prélèvement se situe à 1.5 fois la durée normale du cycle cellulaire (généralement de 12 à 18 heures après le traitement). Étant donné que le temps requis par l'absorption et la métabolisation des produits chimiques d'essai ainsi que leur effet sur la cinétique du cycle cellulaire peuvent influer sur le moment optimal pour la détection des aberrations chromosomiques, on recommande d'effectuer un autre prélèvement 24 heures après le premier. Au premier moment d'échantillonnage, tous les groupes de traitement doivent être traités et des échantillons collectés pour analyse; cependant, lors du/des prélèvement(s) ultérieur(s), seule la dose la plus élevée doit être administrée. Si l'on applique des programmes de traitement qui couvrent plus d'une journée sur justification scientifique, l'échantillonnage devrait normalement intervenir à l'issue d'une période équivalent à environ 1.5 fois la durée normale du cycle cellulaire après la fin du traitement.

Après le traitement et avant le prélèvement des échantillons, les animaux reçoivent une dose appropriée d'un inhibiteur du fuseau (par exemple le Colcemide ou la colchicine) par injection intrapéritonéale et les prélèvements sont ensuite effectués dans un délai approprié, qui est de 3 à 5 heures environ pour la souris et de 2 à 5 heures pour le rat. Les cellules sont prélevées dans la moelle osseuse, dilatées, fixées et colorées, puis analysées en vue de détecter des aberrations chromosomiques (12).

Observations

Les animaux d'essai font l'objet d'un examen clinique général. Les signes cliniques doivent être consignés au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en prenant en considération la période où les effets anticipés devraient être les plus marqués après l'administration. Au moins deux fois par jour pendant la durée du traitement, l'ensemble des animaux fait l'objet d'un constat de morbidité et de mortalité. Tous les animaux doivent être pesés au début de l'étude, au moins une fois par semaine au cours des études à doses répétées, puis lors de l'euthanasie. Pour les études dont la durée est égale ou supérieure à une semaine, la consommation de nourriture doit également être mesurée au moins une fois par semaine. Si le produit chimique testé est administré dans l'eau de boisson, la consommation d'eau est mesurée à chaque changement d'eau et au moins une fois par semaine. Les animaux montrant des signes non létaux de toxicité excessive sont euthanasiés avant la fin de l'essai (11).

Exposition du tissu cible

Lorsque cela se justifie et qu'il n'existe pas d'autres données sur l'exposition (voir paragraphe 44), il convient de réaliser un prélèvement sanguin au(x) moment(s) idoine(s) pour vérifier la concentration des produits chimiques d'essai dans le plasma afin de démontrer que la moelle osseuse a bien été exposée.

Préparation de la moelle osseuse et des chromosomes

Les cellules de moelle osseuse sont obtenues à partir des fémurs ou des tibias des animaux immédiatement après l'euthanasie, exposées à une solution hypotonique et fixées. Les cellules en métaphase sont ensuite étalées sur des lames et colorées selon des méthodes éprouvées (voir (3) (12)).

▼M7

Analyse

Toutes les lames, y compris celles des témoins positifs et négatifs, doivent être codées individuellement avant l'analyse et randomisées afin que l'analyste ignore à quel traitement elles correspondent.

L'indice mitotique sert de mesure de la cytotoxicité et doit être déterminé dans un minimum de 1 000 cellules pour tous les animaux traités (témoins positifs compris) et les animaux non traités ou témoins de véhicule/solvant.

Un minimum de 200 métaphases par animal doit être analysé pour détecter les aberrations chromosomiques, lacunes comprises et non comprises (6). Cependant, si la base de données des témoins négatifs historiques indique une fréquence de fond moyenne des aberrations chromosomiques structurelles < 1 % dans le laboratoire, il convient d'envisager l'examen de cellules supplémentaires. Les aberrations de type chromatidique et chromosomique doivent être consignées séparément et classées par sous-types (cassures, échanges). Les procédures en cours dans le laboratoire doivent assurer que l'analyse des aberrations chromosomiques est réalisée par des examinateurs qualifiés, sous le contrôle de pairs si nécessaire. Étant donné que les procédures de préparation des lames provoquent souvent la rupture d'une certaine fraction des cellules en métaphase, entraînant une perte de chromosomes, toutes les cellules examinées doivent contenir un nombre de centromères égal ou supérieur à 2n ± 2, n étant le nombre haploïde de chromosomes pour cette espèce.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

Les résultats individuels pour chaque animal doivent être présentés sous forme de tableaux. L'indice mitotique, le nombre de cellules en métaphase examinées, le nombre d'aberrations par cellule en métaphase ainsi que le pourcentage de cellules présentant une/des aberration(s) chromosomique (s) structurale(s) doivent être indiqués pour chaque animal. Les différents types d'aberrations chromosomiques structurales doivent être consignés avec leur nombre et leur fréquence pour les groupes de traitement et témoins. Les lacunes, ainsi que les cellules polyploïdes et présentant des chromosomes endoreduplicués sont notées séparément. La fréquence des lacunes est rapportée mais n'est généralement pas incluse dans l'analyse de la fréquence totale des aberrations. S'il n'y a pas de différence de réponse entre sexes, les données des deux sexes peuvent être combinées dans l'analyse statistique. Les données relatives à la toxicité pour l'animal et aux signes cliniques doivent elles aussi figurer dans le rapport.

Critères d'acceptabilité

Les critères suivants déterminent l'acceptabilité de l'essai:

a) Les données relatives aux essais témoins négatifs concomitants sont considérées comme pouvant être ajoutées à la base de données des témoins historiques du laboratoire (voir paragraphes 11 à 14);

b) Les témoins positifs ou témoins d'examen concomitants doivent induire des réponses compatibles avec celles générées par les témoins positifs figurant dans la base de données historiques et produire une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant (voir paragraphes 20 — 21);

c) Le nombre idoine de doses et de cellules est analysé;

d) Les critères de sélection de la dose la plus élevée sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 25 à 28.

Évaluation et interprétation des résultats

À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si:

▼M7

a) au moins un des groupes de traitement présente une augmentation statistiquement significative de la fréquence des cellules présentant des aberrations chromosomiques structurales (lacunes non comprises) par rapport aux témoins négatifs concomitants,

b) un test de tendance approprié montre que l'augmentation est liée à la dose pour au moins l'un des moments d'échantillonnage,

c) les résultats se situent à l'extérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson).

Si seule la dose la plus élevée est étudiée à un moment d'échantillonnage particulier, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si on constate une augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins négatifs concomitants et que les résultats se situent à l'extérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson). Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont également disponibles dans la littérature (13). Une analyse de la relation dose-réponse doit porter sur un minimum de trois groupes de traitement. Les méthodes statistiques doivent utiliser l'animal comme unité expérimentale. Des résultats positifs obtenus dans un essai d'aberration chromosomique indiquent qu'un produit chimique d'essai induit des aberrations chromosomiques dans la moelle osseuse de l'espèce testée.

À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si, dans toutes les conditions expérimentales étudiées:

a) aucun des groupes de traitement ne présente une augmentation statistiquement significative de la fréquence des cellules présentant des aberrations chromosomiques structurales (lacunes non comprises) par rapport aux témoins négatifs concomitants,

b) un test de tendance approprié montre qu'à aucun des moments d'échantillonnage, il n'y a d'augmentation liée à la dose,

c) l'intégralité des résultats se situe à l'intérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson) et,

d) il y a bien eu exposition de la moelle osseuse à la / aux substance(s) chimique(s) d'essai.

Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont disponibles dans la littérature (13). L'exposition de la moelle osseuse à une substance chimique d'essai peut être démontrée par une baisse de l'indice mitotique ou par la mesure de la concentration de la/des substance(s) chimique(s) d'essai dans le plasma ou le sang. Dans le cas d'une administration par voie intraveineuse, des preuves de l'exposition ne sont pas requises. Pour démontrer l'exposition de la moelle osseuse, on peut également avoir recours aux données ADME, obtenues dans le cadre d'une étude indépendante employant la même voie d'administration et la même espèce. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions de l'essai, le produit chimique d'essai n'induit pas d'aberrations chromosomiques structurales dans la moelle osseuse de l'espèce testée.

Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse positive claire ou négative claire.

Lorsque la réponse n'est ni clairement négative ni clairement positive, et afin d'établir la signification biologique d'un résultat (par exemple, une augmentation faible ou marginale), les données doivent être soumises à un jugement d'experts et/ou des investigations plus poussées sur les expériences déjà réalisées. Dans certains cas, il peut être utile d'examiner des cellules supplémentaires ou de répéter l'expérience en modifiant les conditions expérimentales.

▼M7

Dans de rares cas, même après des investigations complémentaires, les données ne permettront pas de conclure que le produit chimique d'essai provoque des résultats clairement positifs ou négatifs. Les résultats de l'étude seront alors considérés comme équivoques.

La fréquence de métaphases polyploïdes et endoreduplicuées par rapport au nombre total de métaphases doit être consignée séparément. Une augmentation du nombre de cellules polyploïdes/endoreduplicuées peut signifier que la substance d'essai est capable d'inhiber les processus mitotiques ou la progression du cycle cellulaire (voir paragraphe 3).

Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Résumé

Produit chimique d'essai:

— source, numéro de lot, date limite d'utilisation si c'est disponible;

— stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue.

Substance mono-constituant:

— apparence physique, hydro-solubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude;

— identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges:

— caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants.

Préparation du produit chimique d'essai:

— justification du choix du véhicule;

— solubilité et stabilité du produit chimique testé dans le solvant/véhicule, si elles sont connues;

— préparation des formulations à administrer dans l'alimentation, l'eau de boisson ou par inhalation;

— déterminations analytiques sur les formulations (stabilité, homogénéité, concentrations nominales, par exemple), lorsqu'elles ont été réalisées.

Animaux d'essai:

— espèces/souches utilisées et justification;

— nombre, âge et sexe des animaux;

— source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.;

— méthode d'identification individuelle des animaux;

— pour les études de courte durée: poids individuel des animaux au début et à la fin de l'essai; pour les études d'une durée supérieure à une semaine: poids individuel des animaux et consommation de nourriture. La plage des poids corporels, ainsi que la moyenne et l'écart type pour chaque groupe doivent également être mentionnés.

▼**M7**

Conditions expérimentales:

— données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule);

— données issues de l'étude de détermination des doses, si elle a été réalisée;

— justification du choix des doses;

— détails sur la préparation du produit chimique d'essai;

— détails sur l'administration du produit chimique d'essai;

— justification de la voie et de la durée d'administration;

— méthodes utilisées pour vérifier que la/les substance(s) chimique(s) d'essai a/ont atteint la circulation générale ou la moelle osseuse;

— dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour) calculée en fonction de la concentration (ppm) du produit chimique d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson, et de la consommation, s'il y a lieu;

— détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau;

— méthode d'euthanasie;

— méthode d'analgésie (le cas échéant);

— description détaillée des calendriers de traitement et d'échantillonnage et justification des choix;

— méthodes de préparation des lames;

— méthodes d'évaluation de la toxicité;

— nature et concentration du produit chimique utilisé pour bloquer la métaphase, dose et heure d'administration avant le prélèvement;

— procédures d'isolement et de conservation des échantillons;

— critères d'analyse des aberrations;

— nombre de cellules en métaphase analysées par animal et nombre de cellules analysées pour déterminer l'indice mitotique;

— critères d'acceptabilité de l'étude;

— critères permettant de conclure que les résultats de l'étude sont positifs, négatifs ou équivoques.

Resultats:

— état de santé des animaux avant et pendant la période d'essai, y compris signes de toxicité;

— indice mitotique, donné séparément pour chaque animal;

— type et nombre d'aberrations et de cellules aberrantes, donnés séparément pour chaque animal;

— nombre total d'aberrations par groupe, moyenne et écart-type;

— nombre de cellules présentant des aberrations par groupe, moyenne et écart-type;

— modifications de la ploïdie, le cas échéant, y compris les fréquences de polyploïdes et/ou de cellules endorédupliquées:

▼M7

— relation dose-réponse, si possible;

— analyses et méthodes statistiques employées;

— données mettant en évidence une exposition de la moelle osseuse;

— données relatives aux témoins négatifs et positifs concomitants, y compris les plages, moyennes et écarts-types;

— données relatives aux témoins négatifs et positifs historiques, y compris les plages, moyennes, écarts-types, limites de contrôle à 95 % pour la distribution, ainsi que période couverte et nombre d'observations;

— critères remplis pour une réponse positive ou négative.

Discussion des résultats.

Conclusions.

Références.

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (2016), «Overview of the set of OECD Genetic Toxicity Test Guidelines and updates performed in 2014-2015». Publications ENV. Série sur les essais et l'évaluation n° 234, OCDE, Paris.

(2) Adler, I.D. (1984), «Cytogenetic Tests in Mammals», in Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, pp. 275-306.

(3) Preston, R.J. et al. (1987), Mammalian in vivo cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, Vol. 189/2, pp. 157-165.

(4) Richold, M. et al. (1990), «In Vivo Cytogenetics Assays», in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.

(5) Tice, R.R. et al. (1994), Report from the working group on the in vivo mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, Vol. 312/3, pp. 305-312.

(6) Adler, I.D. et al. (1998), Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 417/1, pp. 19-30.

(7) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(8) Hayashi, M. et al. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(9) Hayashi, M. et al. (1994), In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.

(10) Fielder, R.J. et al. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in in vivo mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.

▼**M7**

(11) OCDE (2000), «Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation», Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation n^{oo}19, OCDE, Paris.

(12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, Methods in Molecular Biology, Vol. 1044, pp. 147-163.

(13) Lovell, D.P. et al. (1989), «Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays», in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub¬Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

▼**M7**

Appendice 1

DÉFINITIONS

Aneuploïdie: tout écart par rapport au nombre diploïde (ou haploïde) normal de chromosomes, d'un seul ou de plusieurs chromosomes, mais non de multiples d'un ou de plusieurs jeux de chromosomes (cf. polyploïdie).

Centromère: régions d'un chromosome auxquelles les fibrilles du fuseau sont associées pendant la division de la cellule et qui permettent le mouvement ordonné des chromosomes-filles vers les pôles des cellules-filles.

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Aberration de type chromatidique: lésion chromosomique structurale se traduisant par une cassure d'une seule chromatide ou par une cassure et une réunion entre chromatides.

Aberration de type chromosomique: lésion chromosomique structurale se traduisant par une cassure, ou par une cassure et une réunion, des deux chromatides sur le même site.

Endoreduplication: processus par lequel le noyau, après une période S de réplication de l'ADN, n'entre pas en mitose mais recommence une nouvelle période S. Il en résulte des chromosomes comptant 4, 8, 16,… chromatides.

Lacune: lésion achromatique inférieure à la largeur d'une chromatide, marquée par un défaut d'alignement minime des chromatides.

Indice mitotique: ratio entre le nombre de cellules en mitose et le nombre total de cellules dans une population, donnant une mesure de la vitesse de prolifération de cette population de cellules.

Aberration numérique: modification du nombre de chromosomes par rapport au nombre normal caractéristique des animaux employés (aneuploïdie).

Polyploïdie: aberration chromosomique numérique se traduisant par une modification du nombre de jeux de chromosomes, et non par une modification numérique touchant une partie du jeu de chromosomes (cf. aneuploïdie).

Aberration chromosomique structurale: modification de la structure des chromosomes, détectable par un examen au microscope des cellules au stade de la métaphase et apparaissant sous la forme de délétions, fragmentations et modifications intrachromosomiques ou interchromosomiques.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼M7

Appendice 2

PLAN FACTORIEL UTILISÉ POUR IDENTIFIER LES DIFFÉRENCES ENTRE SEXES DANS L'ESSAI D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE IN VIVO

Plan factoriel et analyse factorielle

Selon cette démarche, un minimum de 5 mâles et de 5 femelles sont exposés à chaque concentration d'essai, ce qui conduit à utiliser un minimum de 40 animaux (20 mâles et 20 femelles, auxquels s'ajoutent les témoins positifs nécessaires).

La démarche décrite ici, qui correspond à l'une des formes simples du plan factoriel, équivaut à une analyse de variance à deux facteurs, dans laquelle le sexe et la concentration sont les facteurs principaux. Les données peuvent être analysées à l'aide de nombreux progiciels statistiques standard tels que SPSS, SAS, STATA ou Genstat, ou en utilisant le logiciel R.

À partir de l'ensemble de données, on détermine la variabilité entre les sexes, la variabilité entre les concentrations et la variabilité liée à l'interaction entre sexe et concentrations. Chacun de ces termes est comparé à une estimation de la variabilité entre les animaux répartis au sein des groupes d'animaux de même sexe exposés à la même concentration. On trouvera plus de précisions sur cette méthode dans les manuels de statistiques classiques (voir les références) et dans les fichiers d'aide fournis avec les logiciels statistiques.

On examine ensuite le terme d'interaction sexe x concentration dans un tableau ANOVA ([1]). En l'absence de terme d'interaction significatif, la combinaison des valeurs inter-sexes ou inter-niveaux de concentration permet de réaliser des tests statistiques valides entre les niveaux, en se basant sur le terme de variabilité intra-groupe combinée fourni par l'ANOVA.

L'analyse se poursuit par la partition de la variabilité estimée entre concentrations, de façon à obtenir des contrastes, ce qui permet d'établir les contrastes linéaires et quadratiques des réponses pour l'ensemble des niveaux de concentration. Lorsqu'il y a une interaction significative sexe x concentration, ce terme peut à son tour être partitionné en contrastes d'interaction linéaire x sexe et quadratique x sexe. Ces termes permettent de vérifier si les réponses aux concentrations sont parallèles pour les deux sexes ou si elles diffèrent selon le sexe.

L'estimation de la variabilité intra-groupe combinée peut servir à tester l'écart entre les moyennes en les comparant deux à deux. Ces comparaisons peuvent se faire entre les moyennes pour les deux sexes et entre les moyennes pour les différents niveaux de concentration (comparaisons avec les témoins négatifs, par exemple). En cas d'interaction significative, des comparaisons peuvent être faites entre les moyennes des différentes concentrations pour un même sexe, ou entre les moyennes des deux sexes à la même concentration.

Références

De nombreux manuels de statistiques traitent de la théorie, de la conception, de la méthodologie, de l'analyse et de l'interprétation des plans factoriels, depuis les analyses les plus simples, à deux facteurs, jusqu'aux formes complexes utilisées dans la conception de l'expérimentation. La liste ci-dessous n'est pas exhaustive. Certains ouvrages comportent des exemples d'application de ce type de démarches, accompagnés parfois d'un code permettant l'exécution des analyses sous différents logiciels.

([1]) Les statisticiens qui suivent une démarche de modélisation telle que l'utilisation de modèles linéaires généralisés (MLG) peuvent conduire l'analyse d'une manière différente mais comparable; toutefois, ils n'obtiendront pas nécessairement le traditionnel tableau ANOVA, qui date des approches algorithmiques du calcul statistique développées à l'ère pré-informatique.

▼**M7**

Box, G.E.P, Hunter, W.G. et Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

B.12. TEST DU MICRONOYAU SUR ÉRYTHROCYTES DE MAMMIFÈRES

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 474 (2016) de l'OCDE. Elle s'inscrit dans une série de méthodes d'essai sur la toxicologie génétique. Par ailleurs, un document de l'OCDE qui fournit des informations succintes sur les essais de génotoxicité et donne une vue d'ensemble des modifications récemment apportées à ces lignes directrices a été élaboré (1).

Ce test du micronoyau pratiqué in vivo chez les mammifères se prête particulièrement bien à l'évaluation de la génotoxicité, car, malgré des variations entre les espèces, les facteurs du métabolisme in vivo, la pharmacocinétique et les processus de réparation de l'ADN sont actifs et contribuent aux réponses. Le test est également considéré comme utile pour explorer plus avant un effet génotoxique détecté dans un système in vitro.

Le test du micronoyau in vivo est pratiqué chez des mammifères en vue de détecter des lésions des chromosomes ou de l'appareil mitotique d'érythroblastes résultant de l'action d'une substance d'essai. Il évalue la formation de micronoyaux dans des érythrocytes prélevés dans la moelle osseuse ou dans les cellules du sang périphérique d'animaux, généralement des rongeurs.

Le test du micronoyau a pour but d'identifier les produits chimiques qui engendrent des lésions cytogénétiques induisant la formation de micronoyaux contenant des fragments de chromosomes retardataires ou des chromosomes entiers.

Lorsqu'un érythroblaste de moelle osseuse se transforme en érythrocyte immature (parfois désigné sous le terme d'érythrocyte polychromatique, ou de réticulocyte), le noyau principal est expulsé et les éventuels micronoyaux qui se sont formés peuvent subsister dans le cytoplasme. La visualisation ou la détection des micronoyaux dans ces cellules est facilitée par l'absence de noyau principal. Un accroissement de la fréquence des érythrocytes immatures micronucléés chez les animaux traités est le signe d'une lésion chromosomique structurale ou numérique induite.

Les érythrocytes micronucléés nouvellement formés sont identifiés et dénombrés, une fois colorés, par examen visuel au microscope ou par analyse automatique. L'utilisation d'une plateforme d'analyse automatique facilite considérablement le dénombrement d'un nombre suffisant d'érythrocytes immatures dans le sang périphérique ou la moelle osseuse d'animaux adultes. Ce type de plateforme constitue une alternative acceptable à l'évaluation manuelle (2). D'après des études comparatives, de telles méthodes, couplées à l'utilisation de normes d'étalonnage idoines, offrent une reproductibilité et une sensibilité inter-laboratoires et intra-laboratoire supérieures aux performances de l'examen manuel au microscope (3) (4). Parmi les systèmes automatisés pouvant mesurer la fréquence des érythrocytes micronucléés, on peut citer les cytomètres en flux (5), les plateformes d'analyse d'images (6) (7) et les cytomètres à balayage laser (8).

Bien que cela ne fasse habituellement pas partie de l'essai, les fragments de chromosomes peuvent être distingués des chromosomes entiers d'après un certain nombre de critères. Ceux-ci comprennent la détection de la présence ou de l'absence de kinétochore ou d'ADN centromérique, tous deux étant caractéristiques d'un chromosome intact. L'absence de kinétochore ou d'ADN centromérique indique que le micronoyau ne contient que des fragments de chromosomes, tandis que la présence de l'un de ces éléments signe une perte chromosomique.

Les définitions des termes employés figurent à l'appendice 1

▼M7

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

La moelle osseuse de jeunes rongeurs adultes est le tissu cible des lésions génétiques dans le cadre de cet essai, les érythrocytes étant produits dans ce tissu. Le comptage des érythrocytes immatures micronucléés dans le sang périphérique peut aussi être effectué chez d'autres espèces de mammifères qui ont démontré une sensibilité suffisante pour permettre la détection de produits chimiques provoquant des aberrations chromosomiques structurales ou numériques dans ces cellules (par induction de micronoyaux dans les érythrocytes immatures), et à condition que ce choix soit justifié sur le plan scientifique. La fréquence des érythrocytes immatures micronucléés est le principal effet mesuré. Il est également possible de mesurer la fréquence des érythrocytes matures micronucléés dans le sang périphérique chez les espèces ne présentant pas une forte sélection splénique contre les cellules micronucléées et lorsque les animaux sont traités en continu pendant une période supérieure à la durée de vie d'un érythrocyte chez l'espèce concernée (par exemple, quatre semaines au moins chez la souris).

Cet essai n'est pas pertinent s'il est prouvé que le/les produit(s) chimique(s) d'essai, ou leur(s) métabolite(s), n'atteindront pas le tissu cible.

Avant d'utiliser la méthode d'essai pour générer des données avec pour objectif recherché l'application réglementaire, on examinera si, et si oui, pourquoi, elle peut fournir des résultats adéquats à cette fin. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Les animaux sont exposés au produit chimique d'essai par une voie d'exposition idoine. Si l'on utilise la moelle osseuse, les animaux sont euthanasiés au(x) moment(s) approprié(s) après le traitement; la moelle est extraite, préparée sur des lames et colorée (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Lorsqu'on utilise le sang périphérique, ce dernier est prélevé au(x) moment(s) approprié(s) après le traitement; les préparations sont ensuite réalisées et colorées (12) (16) (17) (18). Lors d'une administration aigüe du traitement, il importe d'effectuer le prélèvement de moelle osseuse ou de sang périphérique à un moment où l'induction d'érythrocytes immatures micronucléés par le traitement peut être détectée. Dans le cas d'un prélèvement de sang périphérique, un laps de temps suffisant doit s'être écoulé pour que ces éléments apparaissent dans la circulation sanguine. Les préparations sont analysées en vue de la détection de micronoyaux, par visualisation directe à l'aide d'un microscope, par analyse d'image, par cytométrie en flux ou par cytométrie à balayage laser.

VÉRIFICATION DES COMPÉTENCES DU LABORATOIRE

Épreuves de compétence

Afin d'établir qu'il possède une expérience suffisante pour mener à bien l'essai avant de l'utiliser en routine, le laboratoire doit avoir démontré sa capacité à reproduire les résultats attendus d'après les données publiées (17) (19) (20) (21) (22) concernant les fréquences de micronoyaux avec un minimum de deux produits chimiques témoins positifs (y compris des réponses faibles induites par des doses faibles de témoins positifs) tels que ceux énumérés au tableau 1, et avec des témoins de véhicule/solvant compatibles (voir paragraphe 26). Les doses utilisées dans le cadre de ces expériences doivent produire des augmentations reproductibles qui sont fonction de la dose administrée, et démontrer la sensibilité et la plage dynamique du système d'essai sur le tissu en question (moelle osseuse ou sang périphérique); la méthode d'analyse retenue doit être celle qui sera employée par le laboratoire. Cette exigence ne s'applique pas aux laboratoires possédant déjà une expérience, c'est-à-dire qui disposent d'une base de données historiques telle que définie aux paragraphes 14 à 18.

Données des témoins historiques

Dans le cadre de la vérification des compétences, le laboratoire devra établir:

— une plage et une distribution des témoins positifs historiques, et

▼M7

— une plage et une distribution des témoins négatifs historiques.

Lors de l'acquisition initiale de données en vue d'établir une distribution des témoins négatifs historiques, les données des témoins négatifs concomitants doivent être cohérentes avec les données publiées, lorsqu'elles existent. Puis, à mesure que de nouvelles données expérimentales viennent étoffer la plage de distribution des témoins historiques, les données des témoins négatifs concomitants doivent idéalement se situer dans les limites de contrôle à 95 % de cette distribution. La base des données historiques du laboratoire relatives aux témoins négatifs doit être statistiquement robuste pour permettre au laboratoire d'évaluer la distribution de ses données des témoins négatifs. La littérature suggère qu'un minimum de 10 expériences peut-être nécessaire, sachant qu'il serait préférable d'en compter au moins 20, réalisées dans des conditions expérimentales similaires. Les laboratoires doivent avoir recours à des méthodes de contrôle de la qualité telles que des graphiques statistiques (cartes C ou cartes X-barre, par exemple (23)), afin de déterminer la variabilité de leurs données et de démontrer leur maîtrise de la méthodologie. On trouve dans la littérature (24) d'autres recommandations sur la façon de constituer et d'utiliser ces données historiques (critères d'inclusion et d'exclusion des données dans la base et critères d'acceptabilité pour une expérimentation donnée).

Si, au cours des expériences visant à vérifier sa compétence (comme décrit au paragraphe 13), le laboratoire n'a pas réalisé un nombre suffisant d'expériences pour établir une distribution des témoins négatifs statistiquement robuste (voir paragraphe 15), on peut accepter que la distribution soit construite au cours des premiers tests de routine. Cette approche devra suivre les recommandations établies dans la littérature (24) et les résultats des témoins négatifs obtenus lors de ces expériences devront être cohérents avec les données publiées des témoins négatifs.

Toute modification du protocole expérimental doit être étudiée à la lumière de ses répercussions sur la cohérence des nouvelles données avec celles de la base de données des témoins historiques. Seules des incohérences majeures justifient l'établissement d'une nouvelle base de données des témoins historiques, après confirmation de la différence de distribution des données par des experts (voir paragraphe 15). Lors de la constitution de cette nouvelle base de données, le laboratoire n'a pas forcément besoin d'une base de données de témoins négatifs complète pour autoriser la conduite d'un essai, à condition qu'il puisse apporter la preuve que les valeurs des témoins négatifs concomitants sont cohérentes avec la précédente base de données ou avec les données publiées correspondantes.

Les données des témoins négatifs désignent l'incidence des érythrocytes immatures micronucléés chez chaque animal. Les témoins négatifs concomitants se situent idéalement dans les limites de contrôle à 95 % de la distribution des données historiques des témoins négatifs contenues dans la base de données du laboratoire. Lorsque les données des témoins négatifs concomitants se situent en dehors des limites de contrôle à 95 %, leur inclusion dans la distribution des témoins historiques peut être acceptable, à condition que ces données ne soient pas exagérément extrêmes et qu'il soit prouvé que le système d'essai est «sous contrôle» (voir paragraphe 15) et qu'il n'y a pas eu de défaillance technique ou humaine.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparations

Sélection des espèces animales

Il convient d'employer de jeunes animaux adultes sains issus de souches courantes de laboratoire. On pourra choisir des souris, des rats, ou toute autre espèce de mammifère appropriée. Si l'examen porte sur le sang périphérique, il doit être établi que l'élimination par la rate des cellules micronucléées ne compromet pas la détection des micronoyaux induits chez l'espèce sélectionnée. Cela a été clairement démontré pour le sang périphérique chez la souris et le rat

▼M7

(2). L'utilisation d'une espèce autre que le rat ou la souris doit être scientifiquement justifiée dans le rapport. Si des animaux autres que des rongeurs sont utilisés, il est recommandé que la mesure des micronoyaux induits soit intégrée à un autre essai de toxicité pertinent.

Conditions d'encagement et d'alimentation des animaux

Pour les rongeurs, la température de l'animalerie doit être maintenue à 22°C (± 3°C). L'humidité relative, qui est idéalement de 50 à 60 %, doit atteindre au moins 40 % et de préférence ne pas dépasser 70 %, sauf durant le nettoyage du local. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire des animaux est le régime classique de laboratoire avec eau potable à volonté. Le choix des aliments peut être influencé par la nécessité d'assurer une bonne incorporation du produit chimique dans la nourriture si l'administration se fait par cette voie. Les rongeurs sont mis en cage par petits groupes d'individus de même sexe (cinq au maximum par cage) recevant le même traitement, si aucun comportement agressif n'est à craindre, de préférence dans des cages à fond plein dotées d'un enrichissement environnemental approprié. Les animaux peuvent être encagés individuellement si cela est justifié du point de vue scientifique.

Préparation des animaux

On choisit habituellement de jeunes animaux adultes sains (les rongeurs sont idéalement âgés de 6 à 10 semaines au début du traitement, bien que des animaux un peu plus âgés soient également acceptables), qui sont répartis de manière aléatoire entre les groupes témoins et les groupes de traitement. Chaque animal est identifié individuellement selon une méthode sans cruauté, la moins invasive possible (par exemple, baguage, étiquetage, pose d'une puce électronique ou identification biométrique, en évitant l'entaillage des oreilles ou la phalangectomie) et gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire. Les cages doivent être placées de manière à réduire au minimum l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats. Il convient d'éviter toute contamination croisée entre le témoin positif et le produit chimique d'essai. Au début de l'étude, la variation pondérale des animaux doit être minimale et ne pas dépasser ± 20 % du poids moyen de chaque sexe.

Préparation des doses

Lorsque les produits chimiques testés sont solides, ils sont dissous ou mis en suspension dans des solvants ou des véhicules appropriés, ou incorporés aux aliments ou à l'eau de boisson avant d'être administrés aux animaux. Les produits chimiques liquides peuvent être administrés directement ou dilués avant d'être administrés. En cas d'exposition par inhalation, les produits chimiques d'essai peuvent être administrés sous forme de gaz, de vapeur ou d'aérosol solide ou liquide, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. On utilisera des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage et définissent les conditions de stockage appropriées.

Conditions de l'essai

Solvant/véhicule

Le solvant/véhicule ne doit pas produire d'effets toxiques aux doses utilisées, ni pouvoir réagir avec les produits chimiques d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données de référence faisant état de leur compatibilité. Il est recommandé d'envisager en premier lieu l'utilisation d'un solvant/véhicule aqueux chaque fois que c'est possible. Parmi les exemples de solvants/véhicules compatibles couramment utilisés figurent notamment l'eau, le sérum physiologique, les solutions de méthylcellulose, les solutions de carboxyméthylcellulose sodique, l'huile d'olive et l'huile de maïs. En l'absence de données historiques ou publiées significatives montrant qu'aucun micronoyau ou effet délétère n'est induit par un solvant/véhicule inhabituel sélectionné, une étude initiale devra être réalisée afin d'établir l'acceptabilité du témoin pour le solvant/véhicule.

▼M7

Témoins

Témoins positifs

Chaque essai doit normalement inclure un groupe d'animaux traités avec un produit chimique utilisé comme témoin positif. Cette étape peut être évitée une fois que le laboratoire d'essai a apporté la preuve de ses compétences pour la conduite de l'essai et établi la plage des témoins positifs historiques. Lorsqu'aucun groupe témoin positif n'est utilisé simultanément, des témoins d'examen (lames fixées et non colorées ou échantillons de suspension cellulaire, selon les besoins de la méthode d'examen) devront être inclus dans chaque expérience. Pour ce faire, on pourra intégrer à l'étape d'examen des échantillons de référence idoines obtenus et stockés lors d'un essai séparé sur témoin positif mené périodiquement (par exemple, tous les 6 à 18 mois), notamment au cours de l'épreuve de compétence et par la suite sur une base régulière, si nécessaire.

Les produits chimiques utilisés comme témoins positifs doivent produire, de façon fiable, un accroissement détectable de la fréquence des micronoyaux par rapport au niveau spontané. Si l'examen est effectué manuellement au microscope, les doses des témoins positifs doivent être choisies de telle sorte que les effets soient nets mais que l'identité des lames codées ne soit pas évidente pour l'examinateur. Il est possible d'administrer le témoin positif par une voie différente de celle du produit chimique d'essai, de suivre un autre programme de traitement et de n'effectuer qu'un seul prélèvement d'échantillon. De plus, l'emploi de témoins positifs appartenant à la même classe chimique peut être envisagé, s'il y a lieu. Des exemples de produits chimiques utilisés comme témoins positifs figurent au tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1

Exemples de produits chimiques utilisés comme témoins positifs

Produit chimique et n°CAS
Méthanesulfonate d'éthyle [n°CAS 62-50-0]
Méthanesulfonate de méthyle [n°CAS 66-27-3]
Ethylnitrosourée [n°CAS 759-73-9]
Mitomycine C [n°CAS 50-07-7]
Cyclophosphamide (monohydratée) [n°CAS 50-18-0 (n°CAS 6055-19-2)]
Triéthylènemélamine [n°CAS 51-18-3]
Colchicine [n°CAS 64-86-8] ou vinblastine [n°CAS 865-21-4] — comme aneugènes

Témoins négatifs

Pour chaque moment d'échantillonnage, il faut inclure un groupe d'animaux témoins négatifs, qui seront manipulés de la même façon que les groupes traités, mais ne recevront pas le produit chimique d'essai. Si un solvant/véhicule est utilisé pour administrer le produit chimique d'essai, ce solvant/véhicule doit être administré au groupe témoin. Toutefois, si des résultats obtenus antérieurement par le laboratoire d'essai démontrent que la variabilité interindividuelle et la fréquence des cellules comportant des micronoyaux provenant de témoins négatifs sont stables pour chaque moment d'échantillonnage, un seul échantillonnage peut alors suffire pour les témoins négatifs. Dans ce cas, il doit intervenir au moment du premier prélèvement effectué dans le cadre de l'étude.

▼M7

Si le sang périphérique est utilisé, un échantillon prélevé avant le traitement peut aussi tenir lieu de témoin négatif pour les études de courte durée, lorsque les résultats sont conformes aux valeurs de la base de données des témoins historiques du laboratoire. Il a été démontré chez le rat que le prélèvement de faibles volumes (par exemple, inférieurs à 100 µl/jour) avant le traitement avait un impact minime sur la fréquence de fond des micronoyaux (25).

MODE OPÉRATOIRE

Nombre et sexe des animaux

En règle générale, la réponse des micronoyaux est similaire chez les animaux mâles et femelles (26), et la plupart des études pourrait donc être réalisée sur l'un ou l'autre des deux sexes. Des données démontrant des différences significatives entre les mâles et les femelles (par exemple sur le plan de la toxicité systémique, du métabolisme, de la biodisponibilité de la toxicité sur la moelle osseuse, etc. comprenant également des données provenant par exemple d'études de détermination des doses) encouragent l'utilisation des deux sexes. Il peut donc être plus approprié dans ce cas de mener une étude sur les deux sexes, par exemple dans le cadre d'une étude de toxicité à doses répétées. Il pourrait être judicieux de recourir à un plan factoriel en cas d'utilisation des deux sexes. Des précisions sur cette méthode d'analyse des données sont fournies à l'appendice 2.

La taille des groupes au début de l'étude doit permettre de disposer dans chaque groupe d'au moins cinq animaux analysables du même sexe ou de chaque sexe si les deux sont utilisés. Si l'exposition humaine est spécifique pour un sexe, par exemple dans le cas de certains produits pharmaceutiques, l'essai sera pratiqué sur des animaux du sexe approprié. À titre d'information concernant le nombre maximum d'animaux généralement requis, une étude sur moelle osseuse conduite selon les paramètres établis au paragraphe 37, impliquant trois groupes de traitement et des groupes de témoins négatifs et de témoins positifs concomitants (chaque groupe étant composé de cinq animaux du même sexe) nécessitera entre 25 et 35 animaux.

Niveaux de dose

Si l'on procède à une étude préliminaire de détermination des doses à administrer parce qu'on ne dispose pas de données fiables pour orienter le choix des doses, cette étude préliminaire doit être effectuée dans le même laboratoire, en utilisant une espèce, une souche, un sexe et un régime de traitement identiques à ceux de l'étude principale (27). Elle devra avoir pour objectif de déterminer la dose maximale tolérée (DMT), définie comme la dose la plus élevée qui sera tolérée sans faire apparaître de toxicité limitante, dans le cadre de la durée de l'étude (par exemple, induisant une baisse du poids corporel ou une cytotoxicité du système hématopoïétique, mais ne provoquant pas la mort ou des signes de douleur, de souffrance ou de détresse imposant de sacrifier les animaux (28)).

La dose la plus élevée peut aussi être définie comme la dose qui produit une toxicité dans la moelle osseuse (par exemple une diminution de plus de 50 % de la proportion d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes dans la moelle osseuse ou le sang périphérique, sans que cette proportion devienne inférieure à moins 20 % de la valeur témoin). Toutefois, l'analyse des cellules positives au marqueur CD71 dans la circulation sanguine périphérique (par cytométrie en flux) révèle que cette fraction d'érythrocytes immatures très jeunes répond plus rapidement aux substances toxiques que la cohorte plus importante d'érythrocytes immatures positifs à l'ARN. Par conséquent, la toxicité peut apparaître supérieure dans le cadre d'expériences prévoyant une exposition aigüe suivie de l'examen des érythrocytes immatures positifs au marqueur CD71 par rapport aux dispositifs d'essai qui recensent les érythrocytes immatures en fonction de leur contenu ARN. Pour cette raison, lorsque l'expérience prévoit cinq jours de traitement ou moins, la dose la plus élevée du produit chimique d'essai entrainant une toxicité peut se définir comme la dose causant une réduction statistiquement significative de la proportion d'érythrocytes positifs au marqueur CD71 par rapport au total des érythrocytes, sans descendre en dessous de 5 % de la valeur témoin (29).

▼M7

Les produits chimiques d'essai dont les propriétés toxicocinétiques sont saturées ou qui induisent un processus de détoxification pouvant se traduire par une baisse de l'exposition après une administration à long terme peuvent faire exception aux critères d'établissement des doses et doivent être évalués au cas par cas.

Pour obtenir des informations sur la relation dose-réponse, une étude complète doit comporter un groupe témoin négatif et au moins trois niveaux de doses, séparés en règle générale par un facteur de 2, et de 4 au maximum. Si le produit chimique d'essai ne provoque aucune toxicité dans le cadre d'une étude de détermination des doses à administrer, ou d'après les données disponibles, la dose la plus élevée par période d'administration de 14 jours ou plus doit être de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour ou, pour des périodes d'administration de moins de 14 jours, de 2 000 mg/kg de poids corporel/jour. En revanche, si le produit chimique d'essai provoque une toxicité, la dose administrée la plus élevée devra correspondre à la DMT et les niveaux de dose employés devront de préférence s'étendre de la dose maximale à une dose induisant peu ou pas de toxicité. Lorsqu'une toxicité sur le tissu cible (moelle osseuse) est observée à tous les niveaux de doses administrés, il est conseillé de procéder à des études complémentaires à des doses non toxiques. Les études visant à caractériser davantage les informations sur la relation quantitative dose-réponse peuvent nécessiter un ou plusieurs groupes de traitement supplémentaires. Enfin, ces limites peuvent varier pour certains types de produits chimiques (par exemple les produits pharmaceutiques à usage humain) faisant l'objet d'exigences spécifiques.

Essai limite

Si les essais préliminaires de détermination des doses ou les données existantes concernant des souches de rongeurs apparentées indiquent qu'un régime de traitement égal ou supérieur à la dose limite (décrite ci-dessous) n'engendre pas d'effets toxiques observables (notamment aucune dépression de la fonction médullaire osseuse ni autre cytotoxicité pour le tissu cible), et si la génotoxicité n'est pas escomptée d'après des études de génotoxicité in vitro ou d'après les données relatives aux produits chimiques structurellement apparentés, une étude complète utilisant trois niveaux de doses peut ne pas être considérée comme nécessaire, à condition qu'il ait été démontré que les produits chimiques d'essai atteignent le tissu cible (moelle osseuse). Dans ce cas, un seul niveau de dose, égal à la dose limite, peut s'avérer suffisant. Pour une période d'administration égale ou supérieure à 14 jours, la dose limite est de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour. Pour des périodes d'administration de moins de 14 jours, la dose limite est de 2 000 mg/kg de poids corporel/jour.

Administration des doses

Lors de la conception d'un essai, il convient de tenir compte de la voie d'exposition humaine anticipée. Par conséquent, les voies d'administration telles que l'alimentation, l'eau de boisson, l'inhalation, l'implantation ainsi que les voies topique, sous-cutanée, intraveineuse, orale (par gavage) et intra-trachéale sont autant de choix valables, sous réserve qu'ils soient justifiés. Dans tous les cas, la voie retenue doit permettre une exposition adéquate du/des tissu(s) cible(s). L'injection intrapéritonéale n'est en général pas recommandée, car elle ne constitue pas une voie d'exposition humaine envisagée, et ne sera utilisée qu'en cas de justification scientifique spécifique. Si le produit chimique d'essai est mélangé à l'alimentation ou à l'eau de boisson, surtout dans le cas d'un dosage unique, il convient de s'assurer que le délai entre l'absorption de nourriture et d'eau et le prélèvement est suffisant pour permettre une détection des effets (voir paragraphe 37). Le volume maximal de liquide administrable en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne doit normalement pas excéder 1 ml/100 g de poids corporel, sauf pour les solutions aqueuses, où un maximum de 2 ml/100 g est acceptable. L'utilisation de volumes plus importants doit être justifiée. Il convient de réduire au minimum la variation du volume administré en ajustant la concentration à tous les niveaux de doses, afin de garantir l'administration d'un volume constant pour un poids corporel donné, sauf pour les produits irritants ou corrosifs dont les effets sont généralement exacerbés lorsqu'on augmente la concentration.

▼M7

Programme de traitement

On réalisera de préférence deux traitements ou plus, administrés à des intervalles de 24 heures, notamment lorsque l'essai est intégré à d'autres études de toxicité. Alternativement, on pourra administrer des traitements simples, si cela s'avère scientifiquement justifié (par exemple dans le cas de produits chimiques d'essai connus pour bloquer le cycle cellulaire). L'administration du produit chimique d'essai peut aussi être fractionnée, à raison de deux traitements le même jour à intervalle de deux à trois heures maximum, afin de faciliter l'administration d'un grand volume. En pareil cas, ou lors d'une administration du produit chimique d'essai par inhalation, le moment d'échantillonnage sera fixé en fonction du moment d'administration de la dernière fraction, ou de la fin de l'exposition.

L'essai peut être réalisé chez la souris ou le rat de trois manières différentes:

a. Le produit chimique d'essai est administré en une seule fois aux animaux. Des échantillons de moelle osseuse sont prélevés au moins deux fois (sur des groupes d'animaux indépendants), au plus tôt 24 heures et au plus tard 48 heures après le traitement, à intervalle(s) approprié(s), sauf s'il est avéré que la demi-vie du produit chimique d'essai est particulièrement longue. Les prélèvements effectués moins de 24 heures après le traitement doivent être justifiés. Les échantillons du sang périphérique sont prélevés au moins deux fois (sur le même groupe d'animaux), au plus tôt 36 heures et au plus tard 72 heures après le traitement, à intervalles appropriés. Au premier moment d'échantillonnage, tous les groupes de traitement doivent être traités et des échantillons collectés pour analyse; cependant, lors du/des prélèvement(s) ultérieur(s), seule la dose la plus élevée doit être administrée. Dès qu'une réponse positive est obtenue, il est inutile de poursuivre les prélèvements, sauf si l'on a besoin d'obtenir des informations quantitatives sur la relation dose-réponse. Les intervalles de prélèvement décrits découlent de la cinétique d'apparition et de disparition des micronoyaux dans ces deux compartiments tissulaires.

b. Lorsque deux traitements sont administrés (par exemple deux traitements à 24 heures d'intervalle), les échantillons doivent être prélevés une seule fois, entre 18 et 24 heures après le traitement final dans le cas de la moelle osseuse, et entre 36 et 48 heures dans celui du sang périphérique (30). Les intervalles de prélèvement décrits découlent de la cinétique d'apparition et de disparition des micronoyaux dans ces deux compartiments tissulaires.

c. Si trois traitements, ou davantage, sont administrés (par exemple trois traitements ou plus à environ 24 heures d'intervalle), les échantillons de moelle osseuse doivent être prélevés au plus tard 24 heures après le traitement final, et ceux de sang périphérique au plus tard 40 heures après le dernier traitement (31). Ce régime de traitement permet de combiner le test des comètes (par exemple, prélèvement 2 à 6 heures après le dernier traitement) et le test du micronoyau, ainsi que d'intégrer le test du micronoyau à des études de toxicité par administration répétée. D'après les données disponibles, l'induction de micronoyaux peut s'observer sur ces délais allongés après trois administrations de traitement, ou davantage (15).

D'autres régimes de traitement ou de prélèvement peuvent être envisagés le cas échéant et sous réserve qu'ils soient scientifiquement justifiés, ainsi que pour faciliter l'intégration avec d'autres essais de toxicité.

Observations

Les animaux d'essai font l'objet d'un examen clinique général. Les signes cliniques doivent être consignés au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en prenant en considération la période où les effets anticipés devraient être les plus marqués après l'administration. Au moins deux fois par jour pendant la durée du traitement, l'ensemble des animaux fait l'objet d'un constat de morbidité et de mortalité. Tous les animaux doivent être pesés au début de l'étude, au moins une fois par semaine au cours des études à doses répétées, puis lors de l'euthanasie. Pour les études dont la durée est égale ou

▼M7

supérieure à une semaine, la consommation de nourriture doit également être mesurée au moins une fois par semaine. Si le produit chimique testé est administré dans l'eau de boisson, la consommation d'eau est mesurée à chaque changement d'eau et au moins une fois par semaine. Les animaux montrant des signes non létaux de toxicité excessive sont euthanasiés avant la fin de l'essai (28). Dans certaines circonstances, la température corporelle des animaux peut être surveillée, une hyper- ou une hypothermie causée par le traitement pouvant fausser les résultats (32) (33) (34).

Exposition du tissu cible

Lorsque cela se justifie et qu'il n'existe pas d'autres données sur l'exposition (voir paragraphe 48), il convient de réaliser un prélèvement sanguin au(x) moment(s) idoine(s) pour vérifier la concentration des produits chimiques d'essai dans le plasma afin de démontrer que la moelle osseuse a bien été exposée.

Préparation de la moelle osseuse et du sang

Les cellules de moelle osseuse sont généralement obtenues à partir des fémurs ou tibias des animaux, immédiatement après l'euthanasie. Le plus souvent, les cellules sont extraites, préparées et colorées suivant des méthodes bien établies. De faibles volumes de sang périphérique peuvent être prélevés, conformément aux normes en vigueur en matière de bien-être animal, soit selon une méthode permettant la survie de l'animal d'essai (par exemple prélèvement dans la veine caudale ou un autre vaisseau sanguin approprié), soit par ponction cardiaque ou prélèvement sur un vaisseau sanguin principal, après l'euthanasie de l'animal. Pour les érythrocytes provenant de la moelle osseuse ou du sang périphérique, suivant la méthode d'analyse, on peut effectuer immédiatement une coloration supravitale des cellules sanguines (16) (17) (18) ou des frottis qui sont ensuite colorés pour analyse microscopique, ou fixés puis colorés de manière idoine pour analyse par cytométrie en flux. L'emploi d'un colorant spécifique de l'ADN [par exemple, l'acridine orange (35) ou l'Hoechst 33258 avec la pyronine-Y (36)] peut éliminer une partie des artefacts associés à l'utilisation d'un colorant non spécifique de l'ADN. Cet avantage n'exclut pas l'utilisation de colorants classiques (par exemple le Giemsa pour l'analyse microscopique). D'autres méthodes, faisant par exemple appel à des colonnes de cellulose pour retirer les cellules nucléées (37) (38), peuvent être utilisées à condition que leur compatibilité avec la préparation d'échantillon dans le laboratoire ait été démontrée.

Lorsque ces méthodes sont applicables, les anticorps anti-kinétochore (39), la méthode FISH associée à des sondes ADN pancentromériques (40) ou encore le marquage in situ par amorçage à l'aide d'amorces pancentromériques, avec un colorant de contraste de l'ADN approprié (41), peuvent être utilisés pour identifier le contenu (chromosomes/fragments chromosomiques) des micronoyaux afin de déterminer si le mécanisme d'induction des micronoyaux est le résultat d'une activité clastogène et/ou aneugène. D'autres méthodes de discrimination des effets clastogènes et aneugènes peuvent être utilisées, à condition que leur efficacité ait été prouvée.

Analyse (manuelle et automatique)

Toutes les lames et échantillons, y compris ceux des témoins positifs et négatifs, doivent être codés individuellement avant tout type d'analyse, et doivent être randomisés afin que l'analyste ne puisse pas connaître le traitement utilisé. Ce codage est inutile si l'on fait appel à un système d'analyse automatique, auquel cas l'analyse ne s'appuie pas sur un examen visuel et ne peut être affectée par un biais de l'opérateur. Pour chaque animal, on détermine la proportion d'érythrocytes immatures dans le nombre total d'érythrocytes (immatures + matures) en comptant au moins 500 érythrocytes dans le cas de la moelle osseuse et 2 000 érythrocytes dans le cas du sang périphérique (42). L'incidence des érythrocytes immatures micronucléés est déterminée sur la base de l'examen d'au moins 4 000 érythrocytes immatures par animal (43). Si la base de données des témoins négatifs historiques indique une fréquence de fond moyenne des érythrocytes immature micronucléés < 0,1 % dans le laboratoire, il convient d'envisager l'examen de cellules supplémentaires. À l'examen des lames, le pourcentage d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes chez les animaux traités ne doit pas être inférieur à 20 % de cette valeur pour les

▼M7

témoins de véhicule/solvant lors de l'analyse microscopique, et pas inférieur à environ 5 % de cette valeur pour les témoins de véhicule/solvant lors de l'analyse par cytométrie des érythrocytes immatures positifs au marqueur CD71 (voir paragraphe 31) (29). Par exemple, pour un essai sur moelle osseuse avec examen microscopique, si la proportion témoin d'érythrocytes immatures dans la moelle osseuse est de 50 %, la limite supérieure de toxicité équivaudra à 10 % d'érythrocytes immatures.

Étant donné que la rate de rat immobilise et détruit les érythrocytes micronucléés, pour maintenir la sensibilité de l'essai lors de l'analyse du sang périphérique chez le rat, il est préférable de circonscrire l'analyse aux érythrocytes immatures micronucléés les plus jeunes. En cas d'utilisation de méthodes d'analyse automatique, ces érythrocytes les plus immatures peuvent être repérés grâce à leur contenu élevé en ARN, ou au niveau élevé de récepteurs de la transferrine (positifs au marqueur CD71) exprimés à leur surface (31). Toutefois, une comparaison directe des différentes méthodes de coloration a révélé que plusieurs méthodes permettaient d'obtenir des résultats satisfaisants, y compris la méthode classique de coloration à l'acridine orange (3) (4).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

Les résultats individuels pour chaque animal doivent être présentés sous forme de tableaux. Le nombre d'érythrocytes immatures examinés, le nombre d'érythrocytes immatures micronucléés et la proportion d'érythrocytes immatures doivent être présentés séparément pour chaque animal analysé. Si des souris sont traitées en continu pendant au moins quatre semaines, il convient de fournir également les données relatives au nombre et à la proportion d'érythrocytes matures micronucléés, si elles ont été recueillies. Les données relatives à la toxicité pour l'animal et aux signes cliniques doivent elles-aussi être consignées.

Critères d'acceptabilité

Les critères suivants déterminent l'acceptabilité de l'essai:

a. Les données relatives aux témoins négatifs concomitants sont considérées comme pouvant être ajoutées à la base de données des témoins historiques du laboratoire (voir paragraphes 15 à 18).

b. Les témoins positifs ou témoins d'examen concomitants doivent induire des réponses compatibles avec celles générées par les témoins positifs et figurant dans la base de données historiques et produire une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant (voir paragraphes 24 et 25).

c. Le nombre idoine de doses et de cellules est analysé.

d. Les critères de sélection de la dose la plus élevée sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 30 à 33.

Évaluation et interprétation des résultats

À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si:

a. au moins un des groupes de traitement présente une augmentation statistiquement significative de la fréquence des érythrocytes immatures micronucléés par comparaison avec le témoin négatif concomitant,

b. un test de tendance approprié montre que l'augmentation est liée à la dose pour au moins l'un des moments d'échantillonnage,

c. des résultats se situent à l'extérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson).

▼M7

Si seule la dose la plus élevée est examinée à un moment d'échantillonnage particulier, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si on constate une augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins négatifs concomitants et que les résultats se situent à l'extérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson). Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont disponibles dans la littérature (44) (45) (46) (47). Une analyse de la relation dose-réponse doit porter sur un minimum de trois groupes de traitement. Les méthodes statistiques doivent utiliser l'animal comme unité expérimentale. Des résultats positifs obtenus dans un test du micronoyau indiquent qu'un produit chimique d'essai induit la formation de micronoyaux, qui résultent de lésions des chromosomes ou de l'appareil mitotique d'érythroblastes chez l'espèce utilisée dans l'essai. Si l'on cherche à détecter des centromères dans les micronoyaux, la mise en évidence de tels micronoyaux pourvus de centromères (par détection d'ADN centromérique ou de kinétochore, signes d'une perte chromosomique) révèle le caractère aneugène du produit chimique d'essai.

À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si, dans toutes les conditions expérimentales étudiées:

a. aucun des groupes de traitement ne présente une augmentation statistiquement significative de la fréquence des érythrocytes immatures micronucléés par comparaison avec les témoins négatifs parallèles,

b. un test de tendance approprié montre qu'à aucun des moments d'échantillonnage, il n'y a d'augmentation liée à la dose,

c. l'intégralité des résultats se situe à l'intérieur de la distribution des données des témoins négatifs historiques (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson), et

d. il y a bien eu exposition de la moelle osseuse à la/aux produits chimiques d'essai.

Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont disponibles dans la littérature (44) (45) (46) (47). L'exposition de la moelle osseuse à un produit chimique d'essai peut être démontrée par une baisse du ratio entre érythrocytes immatures et matures, ou par la mesure de la concentration du produit chimique dans le plasma ou le sang. Dans le cas d'une administration par intraveineuse, la preuve de l'exposition n'est pas nécessaire. Pour démontrer l'exposition de la moelle osseuse, on peut également avoir recours aux données ADME, obtenues dans le cadre d'une étude indépendante employant la même voie d'administration et la même espèce. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions de l'essai, le produit chimique d'essai n'induit pas de micronoyau dans les érythrocytes immatures chez l'espèce testée.

Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse clairement positive ou clairement négative.

Lorsque la réponse n'est ni clairement négative ni clairement positive, et afin d'établir la signification biologique d'un résultat (par exemple, une augmentation faible ou marginale), les données doivent être soumises à un jugement d'experts et/ou des investigations plus poussées sur les expériences déjà réalisées. Dans certains cas, il peut être utile d'examiner des cellules supplémentaires ou de répéter l'expérience en modifiant les conditions expérimentales.

Dans de rares cas, même après des investigations complémentaires, les données ne permettront pas de conclure que le produit chimique d'essai provoque des résultats clairement positifs ou négatifs. Les résultats de l'étude seront alors considérés comme équivoques.

Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Résumé

Produit chimique d'essai:

— source, numéro de lot, date limite d'utilisation si c'est disponible;

▼M7

— stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue.

Substance mono-constituant:

— apparence physique, hydro-solubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude;

— identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges:

— caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants.

Préparation du produit chimique d'essai:

— justification du choix du véhicule;

— solubilité et stabilité du produit chimique dans le solvant/véhicule, si elles sont connues;

— préparation des formulations à administrer dans l'alimentation, l'eau de boisson ou par inhalation;

— déterminations analytiques sur les formulations (stabilité, homogénéité, concentrations nominales, par exemple), lorsqu'elles ont été réalisées.

Animaux d'essai:

— espèce/souche utilisée et justification;

— nombre, âge et sexe des animaux;

— source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.;

— méthode d'identification individuelle des animaux;

— pour les études de courte durée: poids individuel des animaux au début et à la fin de l'essai; pour les études d'une durée supérieure à une semaine: poids individuel des animaux et consommation de nourriture. La gamme des poids corporels, ainsi que la moyenne et l'écart type pour chaque groupe doivent également être mentionnés.

Conditions expérimentales:

— données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule);

— données issues de l'étude de détermination des doses, si elle a été réalisée;

— justification du choix des doses;

— détails sur la préparation du produit chimique d'essai;

— justification de la voie et de la durée d'administration;

— méthodes utilisées pour vérifier que le/les produits chimiques d'essai a/ont atteint la circulation générale ou le tissu cible;

— dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour) calculée en fonction de la concentration (ppm) du produit chimique d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson, et de la consommation, s'il y a lieu;

▼**M7**

— détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau;

— méthode d'euthanasie;

— méthode d'analgésie (le cas échéant);

— description détaillée des programmes de traitement et d'échantillonnage, et justification des choix;

— méthodes de préparation des lames;

— procédures d'isolement et de conservation des échantillons;

— méthodes d'évaluation de la toxicité;

— critères d'analyse des érythrocytes immatures micronucléés;

— nombre de cellules analysées par animal pour déterminer la fréquence des érythrocytes immatures micronucléés ainsi que la proportion d'érythrocytes immatures par rapport aux érythrocytes matures;

— critères d'acceptabilité de l'étude;

— méthodes utilisées pour déterminer si les micronoyaux contiennent des chromosomes entiers ou fragmentés (par exemple, recours aux anticorps anti-kinétochore ou à des sondes d'ADN centromériques), le cas échéant.

Résultats:

— état de santé des animaux avant et pendant la période d'essai, y compris signes de toxicité;

— proportion d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes;

— nombre d'érythrocytes immatures micronucléés, donné séparément pour chaque animal;

— moyenne ± écart-type des érythrocytes immatures micronucléés par groupe;

— relation dose-réponse, si possible;

— analyses et méthodes statistiques employées;

— données relatives aux témoins négatifs et positifs de l'essai, y compris les plages, moyennes et écarts-types;

— données relatives aux témoins négatifs et positifs historiques, avec plages, moyennes, écarts-types, limites de contrôle à 95 % pour la distribution, ainsi que période couverte et nombre de points de données;

— données mettant en évidence une exposition de la moelle osseuse;

— données de caractérisation indiquant si les micronoyaux possèdent des chromosomes entiers ou fragmentés, le cas échéant;

— critères remplis pour une réponse positive ou négative.

▼**M7**

Discussion des résulatts.

Conclusion.

Références.

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (2016), «Overview of the set of OECD Genetic Toxicity Test Guidelines and updates performed in 2014-2015». Publications ENV. Série sur les essais et l'évaluation n° 234, OCDE, Paris.

(2) Hayashi, M. et al. (2007), In vivo erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 627/1, pp. 10-30.

(3) MacGregor, J.T. et al. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, Toxicology Sciences, Vol. 94/1, pp. 92-107.

(4) Dertinger, S.D. et al. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, Toxicological Sciences, Vol. 94/1, pp. 83-91.

(5) Dertinger, S.D. et al. (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing in vivo cytogenetic damage, Mutagenesis, Vol. 26/1, pp. 139-145.

(6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, Mutation Research, Vol. 370/1, pp. 65-73.

(7) Asano, N., Katsuma, Y., Tamura, H., Higashikuni, N. and Hayashi, M. (1998). An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitally stained peripheral blood cells. Mutat Res, 404, 149-154.

(8) Styles, J.A. et al. (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, Cytometry, Vol. 44/2, pp. 153-155.

(9) Heddle, J.A. (1973), A rapid in vivo test for chromosomal damage, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 18/2, pp. 187-190.

(10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, Mutation Research, Vol. 31/1, pp. 9-15.

(11) Heddle, J.A. et al. (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 123/1, pp. 61-118.

(12) Mavournin, K.H. et al. (1990), The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 239/1, pp. 29-80.

(13) MacGregor, J.T. et al. (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, Developments in Toxicology Environmental Science, Vol. 11, pp. 555-558.

▼**M7**

(14) MacGregor, J.T. et al. (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 189/2, pp. 103-112.

(15) MacGregor, J.T. et al. (1990), The in vivo erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, Fundamental and Applied Toxicology, Vol. 14/3, pp. 513-522.

(16) Hayashi, M. et al. (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, Mutation Research/ Genetic Toxicology, Vol. 245/4, pp. 245-249.

(17) CSGMT/JEMS.MMS — The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 278/2-3, pp. 83-98.

(18) CSGMT/JEMS.MMS — The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), Mutagenesis, Vol. 10/3, pp. 153-159.

(19) Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 23/4, pp. 239-273.

(20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 453/1, pp. 45-50.

(21) Hayes, J. *et al*. (2009), The rat bone marrow micronucleus test–study design and statistical power, Mutagenesis, Vol. 24/5, pp. 419-424.

(22) Wakata, A. *et al*. (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 32/1, pp. 84-100.

(23) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(24) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(25) Rothfuss, A. *et al*. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 108-120.

(26) Hayashi, M. *et al*. (1994), *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.

(27) Fielder, R.J. *et al*. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.

▼**M7**

(28) OCDE (2000), «Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation», Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation n° 19, OCDE, Paris.

(29) LeBaron, M.J. *et al*. (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 54/3, pp. 222-228.

(30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, Vol. 10/4, pp. 313-319.

(31) Hayashi, M. *et al*. (2000), *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 35/3, pp. 234-252.

(32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 390/1-2, pp. 79-83.

(33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 413/1, pp. 7-14.

(34) Spencer, P.J. *et al*. (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, Toxicological Sciences, Vol. 97/1, pp. 120-127.

(35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutation Research Letters, Vol. 120/4, pp. 241-247.

(36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, Mutation Research, Vol. 120/4, pp. 269-275.

(37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 213/1, pp. 91-104.

(38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, Mutation Research, Vol. 439/1, pp. 121-126.

(39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*, Mutagenesis, Vol. 5/4, pp. 411-415.

(40) Miller, B.M. *et al*. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, Vol. 6/4, pp. 297-302.

(41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, American Journal of Medical Genetics, Vol. 107/2, pp. 99-104.

(42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, Mutation Research, Vol. 347/2, pp. 97-99.

(43) OCDE (2014), «Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines», Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 198, OCDE, Paris.

▼**M7**

(44) Richold, M. *et al*. (1990), «In Vivo Cytogenetics Assays», in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.

(45) Lovell, D.P. *et al*. (1989), «Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays», in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

(46) Hayashi, M. *et al*. (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, Environmental Health Perspectives, Vol. 102/Suppl 1, pp. 49-52.

(47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 469/2, pp. 233-241.

▼**M7**

Appendice 1

DÉFINITIONS

Centromère: régions d'un chromosome auxquelles les fibrilles du fuseau sont associées pendant la division de la cellule et qui permettent le mouvement ordonné des chromosomes-filles vers les pôles des cellules-filles.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Érythroblaste: Stade précoce du développement d'un érythrocyte, précédant immédiatement la formation de l'érythrocyte immature, et lors duquel la cellule contient encore un noyau.

Kinétochore: Structure protéique se formant au niveau du centromère des cellules eucaryotes, qui relie le chromosome à des polymères microtubulaires provenant du fuseau mitotique au cours de la mitose et de la méiose, et qui agit pendant la division cellulaire pour séparer les chromatides sœurs.

Micronoyau: Petit noyau, présent en plus du noyau principal des cellules et séparé de celui-ci, produit pendant la télophase de la mitose (méiose) par des chromosomes ou des fragments de chromosomes retardataires.

Érythrocyte normochromatique ou mature: Érythrocyte parvenu à maturité complète ayant perdu l'ARN résiduel demeurant après l'énucléation et/ou ayant perdu d'autres marqueurs cellulaires à vie courte qui disparaissent généralement après l'énucléation qui suit la division finale de l'érythroblaste.

Érythrocyte polychromatique ou immature: Érythrocyte nouvellement formé, à un stade intermédiaire de son développement, réagissant aux composants bleus et rouges des colorants classiques du sang tels que la coloration Giemsa-Wright, en raison de la présence d'ARN résiduel. De telles cellules nouvellement formées sont pratiquement identiques aux réticulocytes, observables au moyen d'une coloration vitale sous l'action de laquelle l'ARN résiduel s'agglutine pour former un réticulum. D'autres méthodes, telles que la coloration monochromatique de l'ARN à l'aide de colorants fluorescents, ou le repérage des marqueurs de surface à vie courte tels que le CD71 au moyen d'anticorps fluorescents, sont aujourd'hui utilisées pour détecter les cellules sanguines nouvellement formées. Les érythrocytes polychromatiques, les réticulocytes et les érythrocytes positifs aux marqueurs CD71 sont tous des érythrocytes immatures, correspondant à différents stades d'évolution.

Réticulocyte: Érythrocyte nouvellement formé coloré au moyen d'un colorant vital sous l'action duquel l'ARN cellulaire résiduel s'agglutine pour former un réticulum caractéristique. Réticulocytes et érythrocytes polychromatiques sont des érythrocytes à un stade de développement très proche l'un de l'autre.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼M7

Appendice 2

PLAN FACTORIEL UTILISÉ POUR IDENTIFIER LES DIFFÉRENCES ENTRE SEXES DANS LE TEST DU MICRONOYAU IN VIVO

Plan factoriel et analyse factorielle

Selon cette démarche, un minimum de 5 mâles et de 5 femelles sont exposés à chaque concentration d'essai, ce qui conduit à utiliser un minimum de 40 animaux (20 mâles et 20 femelles, auxquels s'ajoutent les témoins positifs nécessaires).

La démarche décrite ici, qui correspond à l'une des formes simples du plan factoriel, équivaut à une analyse de variance à deux facteurs, dans laquelle le sexe et la concentration sont les facteurs principaux. Les données peuvent être analysées à l'aide de nombreux progiciels statistiques standard tels que SPSS, SAS, STATA ou Genstat, ou en utilisant le logiciel R.

À partir de l'ensemble de données, on détermine la variabilité entre les sexes, la variabilité entre les concentrations et la variabilité liée à l'interaction entre sexe et concentrations. Chacun de ces termes est comparé à une estimation de la variabilité entre les animaux répartis au sein des groupes d'animaux de même sexe exposés à la même concentration. On trouvera plus de précisions sur cette méthode dans les manuels de statistiques classiques (voir les références) et dans les fichiers d'aide fournis avec les logiciels statistiques.

On examine ensuite le terme d'interaction sexe x concentration dans un tableau ANOVA ([1]). En l'absence de terme d'interaction significatif, la combinaison des valeurs inter-sexes ou inter-niveaux de concentration permet de réaliser des tests statistiques valides entre les niveaux, en se basant sur le terme de variabilité intra-groupe combinée fourni par l'ANOVA.

L'analyse se poursuit par la partition de la variabilité estimée entre concentrations, de façon à obtenir des contrastes, ce qui permet d'établir les contrastes linéaires et quadratiques des réponses pour l'ensemble des niveaux de concentration. Lorsqu'il y a une interaction significative sexe x concentration, ce terme peut à son tour être partitionné en contrastes d'interaction linéaire x sexe et quadratique x sexe. Ces termes permettent de vérifier si les réponses aux concentrations sont parallèles pour les deux sexes ou si elles diffèrent selon le sexe.

L'estimation de la variabilité intra-groupe combinée peut servir à tester l'écart entre les moyennes en les comparant deux à deux. Ces comparaisons peuvent se faire entre les moyennes pour les deux sexes et entre les moyennes pour les différents niveaux de concentration (comparaisons avec les témoins négatifs, par exemple). En cas d'interaction significative, des comparaisons peuvent être faites entre les moyennes des différentes concentrations pour un même sexe, ou entre les moyennes des deux sexes à la même concentration.

Références

De nombreux manuels de statistiques traitent de la théorie, de la conception, de la méthodologie, de l'analyse et de l'interprétation des plans factoriels, depuis les analyses les plus simples, à deux facteurs, jusqu'aux formes complexes utilisées dans la conception de l'expérimentation. La liste ci-dessous n'est pas exhaustive. Certains ouvrages comportent des exemples d'application de ce type de démarches, accompagnés parfois d'un code permettant l'exécution des analyses sous différents logiciels.

([1]) Les statisticiens qui suivent une démarche de modélisation telle que l'utilisation de modèles linéaires généralisés (MLG) peuvent conduire l'analyse d'une manière différente mais comparable; toutefois, ils n'obtiendront pas nécessairement le traditionnel tableau ANOVA, qui date des approches algorithmiques du calcul statistique développées à l'ère pré-informatique

▼**M7**

Box, G.E.P, Hunter, W.G. et Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼B

B.13/14. **MUTAGÉNICITÉ — ESSAI DE MUTATION RÉVERSE SUR BACTÉRIES**

1. **MÉTHODE**

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 471, Essai de mutation réverse sur des bactéries (1997).

1.1. INTRODUCTION

L'essai bactérien de mutation réverse est pratiqué sur des souches de *Salmonella typhimurium* et d'*Escherichia coït* auxotrophes à l'égard d'un acide aminé. Il sert à détecter des mutations ponctuelles résultant de la substitution, de l'addition ou de la délétion d'une ou de plusieurs paires de base de l'ADN (1) (2) (3). Le principe de cet essai repose sur la détection de mutations qui inversent des mutations présentes dans la souche d'essai et rétablissent ainsi la capacité fonctionnelle des bactéries de synthétiser un acide aminé essentiel. Les bactéries révertantes sont détectées d'après leur capacité de se développer en l'absence de l'acide aminé requis par la souche d'essai parentale.

Les mutations ponctuelles sont à l'origine de beaucoup de maladies génétiques humaines et de nombreuses données tendent à démontrer que des mutations ponctuelles frappant les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs dans des cellules somatiques jouent un rôle dans le développement de tumeurs tant chez l'homme que chez les animaux de laboratoire. L'essai bactérien de mutation réverse est rapide, peu coûteux et relativement facile à effectuer. Beaucoup de souches utilisées possèdent entre autres particularités, celles de les rendre plus sensibles aux mutations: séquences d'ADN plus sensibles aux mutations au niveau des sites de réversion, augmentation de perméabilité cellulaire pour les grosses molécules, élimination des systèmes de réparation de l'ADN ou favorisation (augmentation) des processus induisant des erreurs lors de la réparation de l'ADN. La spécificité des souches d'essai peut fournir des informations utiles sur les types de mutations induites par les agents génotoxiques. On dispose pour les essais bactériens de mutation réverse de très nombreux résultats pour une grande variété de structures et d'une méthodologie d'essai qui est bien au point et qui peut être appliquée à des substances ayant des propriétés physico-chimiques très diverses, y compris les composés volatils.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Un **essai de mutation réverse** chez *Salmonella typhimurium* ou *Escherichia coli* détecte, chez une souche dont la croissance requiert la présence d'un acide aminé (respectivement histidine ou trytophane), des mutations qui transforment cette souche en une souche dont la croissance s'effectue indépendamment d'un rapport extérieur de cet acide aminé.

Les **mutagènes provoquant la substitution de paires de base** sont des agents qui entraînent le remplacement d'une base de l'ADN. Lors d'un essai de réversion, cette modification peut avoir lieu sur le site de la mutation initiale ou sur un autre site du génome bactérien.

Les **mutagènes décalant le cadre de lecture** sont des agents qui provoquent l'addition ou la délétion d'une ou de plusieurs paires de base dans l'ADN, modifiant ainsi le cadre de lecture dans l'ARN.

▼B

1.3. CONSIDÉRATIONS PRÉLIMINAIRES

L'essai bactérien de mutation réverse porte sur des cellules procaryotes qui diffèrent des cellules de mammifère notamment du point de vue de l'absorption, du métabolisme, de la structure des chromosomes et des processus de répartition de l'ADN. Les essais in vitro nécessitent généralement une activation métabolique exogène. Comme les systèmes d'activation métabolique in vitro ne peuvent pas reproduire parfaitement le métabolisme de cellules de mammifère in vivo, les essais ne fournissent pas directement des informations sur le pouvoir mutagène et carcinogène d'une substance chez les mammifères.

L'essai de mutation réverse sur bactéries est couramment employé comme première étape pour la détection de l'activité génotoxique en général et des mutations ponctuelles en particulier. De nombreuses données démontrent que beaucoup de substances chimiques qui se révèlent positives dans cet essai présentent aussi une activité mutagène dans d'autres essais. Certains agents mutagènes ne sont pas décelés par ces systèmes d'essai. Ces défaillances peuvent tenir à la nature particulière de l'effet détecté, à des différences sur le plan de l'activation métabolique ou à des différences de biodisponibilité. D'autre part, les facteurs qui amplifient la sensibilité de l'essai de mutation réverse sur bactéries peuvent conduire à une surestimation de l'activité mutagène.

L'essai de mutation réverse sur bactéries peut ne pas convenir pour l'évaluation de certaines classes de substances chimiques, par exemple les composés fortement bactéricides (certains antibiotiques, par exemple) et ceux dont on soupçonne (ou on sait) qu'ils interfèrent spécifiquement avec le système de réplication des cellules de mammifère (par exemple les inhibiteurs de la topoisomérase ou certains analogues de nucléosides). Dans de tels cas, des essais de mutation sur des cellules de mammifère peuvent s'avérer plus appropriés.

Bien que de nombreux composés qui donnent un résultat positif à cet essai soient cancérogènes pour les mammifères, la corrélation n'est pas parfaite. Celle-ci dépend de la classe chimique et il existe des substances cancérogènes qui ne sont pas détectées par cet essai parce qu'elles agissent par des mécanismes non génotoxiques ou par des mécanismes qui sont absents des cellules bactériennes.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Des bactéries en suspension sont exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique exogène. Dans le cas de la méthode d'incorporation directe (méthode par étalement), ces suspensions sont mélangées avec la gélose de surface et déposées immédiatement sur le milieu minimal. Dans le cas de la méthode avec préincubation, le mélange de bactéries en suspension-substance testée est incubé et ensuite mélangé avec un couche de gélose de surface avant d'être étalé sur le milieu minimal. Dans les deux techniques, après deux ou trois jours d'incubation, les colonies révertantes sont comptées et leur nombre est comparé à celui des revenants spontanés dans les boîtes témoins traitées avec le solvant.

Plusieurs méthodes permettant de réaliser l'essai de mutation réverse sur bactéries ont été décrites. Parmi celles qui sont communément utilisées figure la méthode par incorporation directe (1) (2) (3) (4), la méthode de la préincubation (2) (3) (5) (6) (7) (8), la méthode de la fluctuation (9) (10) et la méthode par suspension (11). Des méthodes modifiées pour les essais avec des gaz ou des vapeurs ont été décrites (12).

▼B

Les modes opératoires décrits se réfèrent principalement aux méthodes d'incorporation directe et de préincubation. Chacune de ces méthodes peut être utilisée avec et sans activation métabolique. L'utilisation de la méthode avec préincubation permet de détecter plus efficacement l'effet mutagène de certaines substances. Ces substances appartiennent à des classes chimiques qui comprennent les nitrosamines aliphatiques à chaînes courtes, les métaux bivalents, les aldéhydes, les colorants azoïques et les composés diazoïques, les alcaloïdes pyrollizidiniques, les composés allyliques et nitrés (3). Il est également admis que certaines classes de mutagènes ne sont pas toujours détectées par les méthodes conventionnelles telles que l'incorporation directe ou la préincubation. Ces substances doivent être considérées comme des cas particuliers et il est fortement recommandé d'utiliser d'autres méthodes de détection. On a pu mettre en évidence les cas particuliers suivants (ainsi que des exemples de méthodes qui pourraient servir à leur détection): colorants azoïques et composés diazoïques (3) (5) (6) (13), gaz et substances chimiques volatiles (12) (14) (15) (16), glycosides (17) (18). Tout écart par rapport au mode opératoire standard demande à être scientifiquement justifié.

1.5. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.5.1. **Préparations**

1.5.1.1. *Bactéries*

On laisse des cultures fraîches de bactéries se développer jusqu'à la fin de la phase exponentielle ou jusqu'au début de la phase stationnaire de croissance (environ 10^9 cellules par ml). Des cultures en fin de phase stationnaire ne doivent pas être utilisées. Il est essentiel que les cultures utilisées pour cet essai présentent une concentration élevée de bactéries viables. La concentration peut être déterminée à partir des données historiques sur les courbes de croissance des souches bactériennes utilisées ou, lors de chaque essai, par la détermination du nombre de cellules viables à l'aide de la méthode par étalement.

La température d'incubation recommandée est de 37 °C.

Au moins cinq souches de bactéries doivent être employées. Celles-ci doivent comprendre quatre souches de *S. typhimurium* (TA1535, TA1537 ou TA97a ou TA97, TA98 et TA100) pour lesquelles des comparaisons entres laboratoires ont démontré la fiabilité et la reproductibilité de la réponse. Ces souches, qui comportent des paires de bases GC sur les sites primaires de réversion, risquent toutefois de ne pas déceler certains mutagènes oxydants, des agents de réticulation et des hydrazines. Ces substances mutagènes peuvent être détectées à l'aide de souches d'*E. coli* WP2 ou de *S. typhimurium* TA102 (19) qui ont une paire de base AT sur le site primaire de réversion. Par conséquent, il est recommandé de mettre en œuvre la combinaison de souches suivante:

— *S. typhimurium* TA1535, et

— *S. typhimurium* TA1537 ou TA97 ou TA97a, et

— *S. typhimurium* TA98, et

— *S. typhimurium* TA100, et

— *E. coli* WP2 uvrA ou *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) ou *S. typhimurium* TA102.

Pour les mutagènes à pouvoir réticulant, il peut être préférable d'inclure la souche TA102 ou d'ajouter une souche d'*E. coli* pourvue d'un mécanisme de réparation de l'ADN [*E. coli* WP2 ou *E. coli* WP2 (pKM101), par exemple].

▼B

La préparation des cultures souches, la vérification des marqueurs et le stockage doivent s'effectuer suivant des méthodes reconnues. Pour chaque culture souche congelée, il faut démontrer que la croissance exige la présence d'un acide aminé (histidine pour *S. typhimurium* et tryptophane pour *E. coli*). D'autres caractéristiques phénotypiques demandent également à être vérifiées, à savoir la présence ou l'absence de plasmides de résistance, s'il y a lieu [résistance à l'ampicilline des souches TA98, TA100 et TA97a ou TA97, WP2 uvrA et WP2 uvrA (pKM101), et résistance à l'association ampicilline/tétracycline de la souche TA102], ainsi que la présence de mutations caractéristiques (à savoir la mutation rfa chez *S. typhimurium* d'après la sensibilité au cristal violet et la mutation uvrA chez *E. coli* ou uvrB chez *S. typhimurium* d'après la sensibilité aux UV) (2) (3). D'autre part, les souches doivent produire un nombre de colonies de révertants spontanés par boîte qui se situe dans la gamme de fréquence prévue sur la base des données historiques du laboratoire et de préférence être comparable aux valeurs citées dans la littérature.

1.5.1.2. *Milieu*

On utilise une gélose minimale appropriée (composée, par exemple, de milieu minimal E de Vogel-Bonner et de glucose) et une gélose de recouvrement contenant de l'histidine et de la biotine ou du tryptophane pour permettre quelques divisions cellulaires (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Activation métabolique*

Les bactéries sont exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique approprié. Le système le plus communément utilisé est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteur (S9), préparée à partir de foie de rongeur traité avec des indicateurs enzymatiques comme Aroclor 1254 (1) (2) ou une combinaison de phénobarbital et de β-naphthoflavone (18) (20) (21). La fraction post-mitochondriale est généralement utilisée à une concentration comprise entre 5 et 30 % v/v dans le mélange S9. Le choix et la composition du système d'activation métabolique peuvent varier suivant la classe chimique de la substance d'essai. Dans certains cas, il peut être intéressant d'utiliser plusieurs concentrations de la fraction post-mitochondriale. Dans le cas de composés azoïques et diazoïques, un système d'activation métabolique réducteur peut s'avérer plus approprié (6) (13).

1.5.1.4. *Substance d'essai/préparation*

Les substances d'essai solides sont préparées par dissolution ou suspension dans un véhicule ou un solvant approprié, plus éventuellement diluées avant le traitement des bactéries. Les substances d'essai liquides peuvent être ajoutées au système d'essai directement ou après dilution. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas réagir chimiquement avec la substance d'essai ni altérer la survie des bactéries et l'activité du mélange S9 (22). L'emploi d'un solvant/véhicule inhabituel doit être justifié par des données faisant état de sa compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux, chaque fois que cela est possible. Dans les essais de substances qui sont instables dans l'eau, on utilisera des solvants organiques exempts d'eau.

▼B

1.5.2. **Conditions expérimentales**

1.5.2.1. *Souches utilisées (voir point 1.5.1.1)*

1.5.2.2. *Concentration d'exposition*

La cytotoxicité et la solubilité dans le mélange d'essai final sont des critères à prendre en considération pour déterminer la dose la plus élevée à mettre en œuvre.

Un essai préliminaire destiné à déterminer la toxicité et les caractéristiques de solubilité peut être utile. La cytotoxicité peut être détectée par une réduction du nombre de révertants, un éclaircissement ou une diminution du tapis bactérien ou une diminution du taux de survie des cultures traitées. Les systèmes d'activation métabolique peuvent avoir une influence sur la cytotoxicité d'une substance. On conclut à l'insolubilité lorsqu'une précipitation dans le mélange final est observée à l'œil nu dans les conditions réelles de l'essai.

Pour les substances d'essai solubles et non cytotoxiques, on recommande une concentration maximale de 5 mg ou 5 µl par boîte. Pour les substances d'essai non cytotoxiques qui sont insolubles à 5 mg ou 5 µl par boîte, l'essai doit comprendre une ou plusieurs concentrations auxquelles on observe une insolubilité. Pour les substances qui sont déjà cytotoxiques à une concentration inférieure à 5 mg ou 5µl/boîte, l'essai doit être effectué jusqu'à une concentration cytotoxique. Le précipité ne doit pas interférer avec l'évaluation des résultats.

Pour un premier essai, il convient de tester au moins cinq concentrations analysables différentes de la substance d'essai, avec des intervalles d'environ une demi-unité logarithmique, c'est-à-dire $\sqrt{10}$. Pour établir une relation dose-réponse, il peut s'avérer nécessaire de réduire ces intervalles. Dans le cas de substances d'essai contenant des quantités substantielles d'impuretés potentiellement mutagènes, il peut être utile d'effectuer des essais avec des concentrations supérieures à 5 mg ou 5 µl/boîte.

1.5.2.3. *Témoins négatifs et positifs*

Des témoins positifs spécifiques de la souche, et des témoins négatifs (solvant ou véhicule), doivent être inclus dans chaque essai, avec ou sans activation métabolique. Dans le cas des témoins positifs, on utilisera une concentration permettant de démontrer l'efficacité de chaque essai.

Pour les essais avec système d'activation métabolique, le ou les témoins positifs de référence doivent être choisis en fonction du type de souche bactérienne utilisé.

Les substances suivantes sont des exemples de témoins positifs pour les essais avec activation métabolique:

Substance	Numéro CAS	Numéro Einecs
Diméthyl-9,10 anthracène	781-43-1	212-308-4
Diméthyl-7,12 benz[a]anthracène	57-97-6	200-359-5
3enzo[a]pyrène	50-32-8	200-028-5
Amino-2 anthracène	613-13-8	210-330-9

▼B

Substance	Numéro CAS	Numéro Einecs
Cyclophosphamide	50-18-0	200-015-4
Monohydrate de cyclophosphamide	6055-19-2	

La substance suivante convient comme témoin positif pour la méthode d'activation métabolique réductrice:

Substance	Numéro CAS	Numéro Einecs
Rouge Congo	573-58-0	209-358-4

L'amino-2 anthracène ne peut être utilisé comme indicateur unique de l'efficacité du mélange S9. S'il est utilisé, il faut également caractériser chaque lot de S9 avec un mutagène qui requiert une activation métabolique par des enzymes microsomalcs, benzo[a]pyrène et diméthylbenzanthracène par exemple.

Les substances suivantes sont des exemples de témoins positifs spécifiques de souches pour les essais sans activation métabolique exogène:

Substance	Numéro CAS	Numéro Ëinecs	Souche
Azoture de sodium	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 et TA 100
Nitro-2 fluorène	607-57-8	210-138-5	TA 98
Amino-9 acridine	90-45-9	201-995-6	TA 15 37, TA 97 et TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 et TA 97a
Hydropéroxyde de cumène	80-15-9	201-254-7	TA 102
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6	WP2 uvrA et TA 102
N-éthyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2 uvrA et WP2 uvrA (pKM101)
1-oxyde de 4-nitroquinoléine	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2 uvrA et WP2 uvrA (pKM101)
Furylfuramide (AF2)	3688-53-7		Souches contenant des plasmides

D'autres témoins positifs appropriés peuvent être utilisés comme référence. L'utilisation de témoins positifs appartenant à la même classe chimique doit être envisagée, s'ils sont disponibles.

L'essai doit comprendre des témoins négatifs constitués de solvant ou véhicule sans substances d'essai, auxquels sont appliquées les mêmes conditions expérimentales qu'à la substance d'essai. Il faut également inclure des témoins non traités, à moins que des essais antérieurs n'aient démontré que le solvant choisi n'a pas d'effet délétère ou mutagène.

▼B

1.5.3. **Mode opératoire**

Pour la méthode par étalement (1) (2) (3) (4) sans activation métabolique, on ajoute généralement 0,05 ml ou 0,1 ml de la solution à tester, 0,1 ml de culture bactérienne fraîche (contenant environ 10^8 cellules viables) et 0,5 ml de tampon stérile à 2,0 ml de gélose de recouvrement. Pour l'essai avec activation métabolique, on mélange habituellement 0,5 ml du mélange d'activation métabolique contenant une quantité adéquate de fraction post-mitochondriaie (entre 5 et 30 % v/v), les bactéries et la substance d'essai, ou une solution de celle-ci, avec 2,0 ml de gélose de recouvrement. Le contenu de chaque tube est mélangé et versé sur la surface d'un milieu minimal gélosé. On laisse la gélose de recouvrement se solidifier avant incubation.

Dans la méthode de la préincubation (2) (3) (5) (6), la substance d'essai, ou une solution de celle-ci, est préincubée avec la souche d'essai (environ 10^8 cellules viables) et un tampon stérile ou 0,5 ml du système d'activation métabolique généralement pendant 20 minutes ou plus à 30-37 °C. On ajoute ensuite la gélose de recouvrement et on verse le tout sur la surface d'un milieu minimal gélosé. On mélange généralement 0,05 ou 0,1 ml de la substance d'essai, ou d'une solution de celle-ci, 0,1 ml de bactéries et 0,5 ml de mélange S9 ou de tampon stérile avec 2,0 ml de gélose de recouvrement. Pendant la préincubation, les tubes doivent être aérés par agitation.

Pour une bonne estimation de la variation, chaque concentration doit être testée dans trois boîtes de Petri. Le nombre de boîtes peut être limité à deux si cela se justifie scientifiquement. La perte accidentelle d'une boîte n'invalide pas nécessairement l'essai.

Les substances gazeuses ou volatiles doivent être testées en utilisant des méthodes appropriées, par exemple dans des récipients hermétiquement fermés (12) (14) (15) (16).

1.5.4. **Incubation**

Toutes les boîtes d'un essai donné doivent être incubées à 37 °C pendant 48-72 heures. À la fin de la période d'incubation, on compte dans chaque boîte le nombre de colonies révertantes.

2. **RÉSULTATS**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Les données doivent être présentées sous la forme du nombre de colonies révertantes par boîte. Le nombre de colonies révertantes dans les boîtes de témoins négatifs (témoins traités avec le solvant et, le cas échéant, témoins non traités) et positifs doit également être mentionné. Le dénombrement par boîte, le nombre moyen de colonies révertantes par boîte et l'écart-type doivent être indiqués pour la substance d'essai ainsi que pour les témoins positifs et négatifs (non traités et/ou traités au solvant).

Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse nettement positive. Les résultats équivoques doivent être clarifiés par des essais supplémentaires réalisés de préférence dans des conditions expérimentales modifiées. Les résultats négatifs demandent à être confirmés cas par cas. Si la confirmation de résultats négatifs n'est pas jugée nécessaire, une justification doit être fournie. Pour les essais de confirmation, il convient d'envisager une modification des conditions expérimentales, afin d'élargir la gamme des conditions évaluées. Les paramètres susceptibles d'être modifiés comprennent l'écart entre les doses, la méthode de traitement (étalement ou préincubation en milieu liquide) et les conditions d'activation métabolique.

▼B

2.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment un accroissement, dose-dépendant, du nombre de révertants ou une augmentation reproductible du nombre de colonies de revenants par boîte à une ou plusieurs concentrations pour au moins une souche, avec ou sans activation métabolique (23). En premier lieu, il s'agit de prendre en considération la signification biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques (24) mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive.

Si les résultats obtenus avec une substance d'essai ne répondent pas aux critères indiqués ci-dessus, on peut conclure que la substance en question n'est pas mutagène dans cet essai.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats manifestement positifs ou négatifs, dans certains cas rares l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas de conclusion catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Des résultats positifs obtenus à l'essai de mutation réverse sur bactéries indiquent que la substance induit des mutations ponctuelles par substitution de bases ou décalage du cadre de lecture dans le génome de *Salmonella typhimurium* et/ou *Escherichia coli*. Un résultat négatif signifie que, dans les conditions de l'essai, la substance n'est pas mutagène pour l'espèce utilisée dans l'essai.

3. **RAPPORT**

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Solvant/véhicule:

— justification du choix du solvant/véhicule,

— solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Souches:

— souches utilisées,

— nombre de cellules par culture,

— caractéristiques des souches.

Conditions expérimentales:

— quantité de substance d'essai par boite (mg/boîte ou µl/boîte) et justification du choix des doses et du nombre de boîtes par concentration,

— milieux utilisés,

— type et composition du système d'activation métabolique, y compris les critères d'acceptabilité,

— procédés de traitement.

Résultats:

— signes de toxicité,

— signes de précipitation,

— dénombrement par boîte,

▼B

— nombre moyen de colonies révertantes par boîte et écart-type,

— relation dose-réponse, si possible,

— analyses statistiques, le cas échéant,

— données concernant les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs concomitants (étendues, moyennes et écarts-types),

— données concernant les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs antérieurs (étendues, moyennes et écarts-types).

Discussion des résultats.

Conclusions.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.

(2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C, Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.*, 312, pp. 217-233.

(4) Kier, L. D., Brusick, D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-lox Program, *Mutation Res.*, 168, pp. 69-240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura. T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives. *Cancer Letters*, 1, pp. 91-96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*. ed. Nor- poth K. H. and Garner, R. C, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273-285.

(7) Gatehouse. D. G.. Rowland, I. R.. Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenecity Tests*: UKEMS Part 1 Revised, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.

(8) Aeschacher. H. U.. Wolleb, U. and Porchet. L. (1987). Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. *J. Food Safety*, 8, pp. 167-177.

(9) Green, M. H. L, Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutations Res.*, 38, pp. 33-42.

(10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L, Gatehouse, D. and J. W. Bridges (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicitv Test Procedures*, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.

▼B

(11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*. *Environmental Mutagenesis*, 3, pp. 453-465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.*, 307, pp. 335-344.

(13) Privai, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, *Mutation Res.*, 136, pp. 33-47.

(14) Zeiger, E., Anderson B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, pp. 2-141.

(15) Simmon, V., Kauhanen K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, *in Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.

(16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, 1. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, *Environmental Mutagenesis*, 9, pp. 421-441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*, *Cancer Res.*, 39, pp. 3780-3782.

(18) Tamura, G., Gold, C, Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Nail. Acad. Sri, USA*, 77, pp. 4961-4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, *Mutagenesis*, 5, pp. 285-291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: In Vitro *Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.

(21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Tatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in in vitro Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogcn, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, *Mutation Res.*, 88, pp. 343-350.

(23) Claxton, L. D., Allen J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomc Tests for Bacterial Mutagenicity, *Mutation Res.*, 189, pp. 83-91.

▼B

(24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

▼M7

_____

_____

▼**M8**

B.17. ESSAIS *IN VITRO* DE MUTATION GÉNIQUE SUR CELLULES DE MAMMIFÈRES UTILISANT LES GÈNES HPRT ET XPRT

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 476 (2016) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les méthodes d'essai sont régulièrement révisées à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences règlementaires et du bien-être des animaux. La présente version révisée de la méthode d'essai B.17 reflète les connaissances scientifiques acquises après plus de trente années d'expérience de cet essai et résulte également des évolutions d'une nouvelle méthode d'essai distincte, consacrée aux essais *in vitro* de mutation génétique sur les cellules de mammifères menés en utilisant le gène TK (thymidine kinase). La méthode B.17 s'inscrit dans une série de méthodes d'essai sur la toxicologie génétique. L'OCDE a élaboré un document qui fournit des éléments d'information concis sur les essais de toxicologie génétique et donne un aperçu des récents changements qui ont été apportés aux lignes directrices de toxicité génétique de l'OCDE(1).

2. L'essai *in vitro* de mutation génétique sur les cellules de mammifères a pour objectif de détecter des mutations induites par des produits chimiques. Les lignées cellulaires utilisées dans ces essais mesurent les mutations directes dans les gènes rapporteurs, en particulier le gène endogène de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (Hprt pour les cellules de rongeur, HPRT pour les cellules humaines; collectivement désignés dans la présente méthode d'essai par gène Hprt et test HPRT), et le transgène de la xanthine-guanine phosphoribosyl transférase (gpt) (dénommé test XPRT). Les tests de mutation HPRT et XPRT détectent différents éventails d'effets génétiques. Outre les mutations détectées par le test HPRT (substitutions d'une paire de base par une autre, décalages du cadre de lecture, petites délétions et insertions), l'emplacement autosomique du transgène gpt peut permettre de détecter des mutations résultant de délétions importantes et même d'une recombinaison mitotique, qui ne sont pas détectées par le test HPRT parce que le gène Hprt est situé sur le chromosome X (2) (3) (4) (5) (6) (7). À l'heure actuelle, le test XPRT est moins utilisé que le test HPRT à des fins réglementaires.

3. Les définitions des termes employés sont présentées à l'appendice1.

REMARQUES PRÉMIMINAIRES ET LIMITES

4. Les essais conduits *in vitro* requièrent généralement une source exogène d'activation métabolique, mais celle-ci est incapable de reproduire parfaitement les conditions *in vivo*.

5. On prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de conduire à de faux résultats positifs (à savoir une possible interaction avec le système d'essai) non causés par une interaction directe entre le produit chimique d'essai et le matériel génétique de la cellule; ces conditions peuvent être une modification du pH ou de l'osmolalité (8) (9) (10) une interaction avec les composants du milieu (11) (12) ou une cytotoxicité excessive (13). Une cytotoxicité supérieure aux plafonds recommandés tels que définis au paragraphe 19 est considérée comme excessive pour le test HPRT.

▼M8

6. Avant d'utiliser la méthode d'essai sur un mélange pour obtenir des données à des fins réglementaires, il convient de vérifier si, et dans l'affirmative pourquoi, elle peut fournir des résultats acceptables dans ce cadre réglementaire. Cette vérification n'est pas nécessaire si l'essai du mélange répond à des exigences réglementaires.

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. Des cellules mutantes déficientes en Hprt dans le test HPRT ou en xprt dans le test XPRT sont résistantes aux effets cytostatiques de la 6-thioguanine (TG), un analogue de la purine. Les cellules munies de l'enzyme Hprt (dans le test HPRT) ou du Gpt (dans le test XPRT) sont sensibles à la TG, qui entraîne une inhibition du métabolisme et l'arrêt de la division cellulaire. Ainsi, des cellules mutantes peuvent proliférer en présence de TG, tandis que des cellules normales qui contiennent l'enzyme Hprt (test HPRT) ou gpt (test XPRT), ne le peuvent pas.

8. Des cellules en suspension ou en culture monocouche sont exposées au produit chimique d'essai, en présence et en l'absence d'une source exogène d'activation métabolique (voir paragraphe 14), pendant une période appropriée (3-6 heures). Les cellules sont repiquées afin de déterminer la cytotoxicité et de laisser le phénotype s'exprimer avant la sélection des mutants (14) (15) (16) (17). On détermine la cytotoxicité en mesurant la survie relative (SR), à savoir l'efficacité de clonage mesurée immédiatement après le traitement et ajustée pendant le traitement en fonction d'une éventuelle perte cellulaire par rapport au témoin négatif (paragraphe 18 et appendice 2). Les cultures traitées sont maintenues dans un milieu de croissance pendant une période de temps suffisante, caractéristique de chaque type de cellule, afin de permettre une expression phénotypique quasi-optimale des mutations induites (habituellement 7-9 jours minimum). Une fois l'expression phénotypique obtenue, on détermine la fréquence des mutants en ensemençant avec un nombre connu de cellules un milieu contenant l'agent sélectif permettant de détecter les colonies de mutants. Dans un milieu exempt d'agent sélectif, on détermine l'efficacité de clonage (viabilité). Après un temps d'incubation approprié, les colonies sont comptées. On corrige le nombre de colonies de mutants de l'efficacité de clonage au moment de la sélection des mutants pour obtenir la fréquence des mutants.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Préparations

Cellules

9. Les types de cellules utilisés pour les tests de mutation HPRT et XPRT doivent avoir une sensibilité prouvée aux mutagènes chimiques, une efficacité de clonage élevée, un caryotype stable et une fréquence stable de mutants spontanés. Les cellules les plus fréquemment utilisées pour le test HPRT incluent les lignées CHO, CHL et V79 de cellules de hamster chinois, L5178Y de cellules de lymphome de souris, et TK6 de cellules humaines lymphoblastoïdes (18) (19). Les cellules AS52 qui dérivent des lignées CHO et contiennent le transgène gpt (mais pas le gène Hprt) sont utilisées pour le test XPRT (20) (21); L'utilisation d'autres lignées cellulaires doit être justifiée et validée.

10. La stabilité du caryotype et l'absence de contamination par des mycoplasmes sont vérifiées régulièrement dans les lignées cellulaires (22) (23), et les cellules sont écartées si une contamination ou une modification du caryotype est constatée. La durée normale du cycle cellulaire utilisée dans le laboratoire

▼M8

d'essai doit être établie et doit correspondre aux caractéristiques cellulaires publiées. Il convient également de contrôler la fréquence de mutants spontanés dans le stock de cellules maîtresses, et ce stock ne devra pas être utilisé si la fréquence de mutants n'est pas acceptable.

11. Avant d'employer les cultures dans l'essai, il peut être nécessaire de les débarrasser des cellules mutantes qu'elles contiennent, par exemple en utilisant un milieu de culture HAT pour le test HPRT et MPA pour le test XPRT (5) (24) (voir l'appendice 1). Les cellules nettoyées peuvent être cryopréservées, puis décongelées pour servir de stocks de travail. Il est possible d'utiliser pour le test le stock de travail tout juste décongelé une fois atteints les temps de doublement normaux. Dans le cas d'un test XPRT, la culture de routine de cellules AS52 doit se faire dans des conditions qui assurent le maintien du transgène gpt (20).

Milieu et conditions de culture

12. Il convient d'utiliser un milieu de croissance et des conditions d'incubation (récipients de culture, atmosphère humidifiée à 5 % de CO2, et température d'incubation de 37 °C) appropriés pour les cultures. Les cultures cellulaires doivent toujours être maintenues dans des conditions qui garantissent leur croissance en phase exponentielle. Il est particulièrement important de choisir des milieux et des conditions de culture qui stimulent la croissance optimale des cellules pendant la période d'expression et l'efficacité optimale du clonage pour les cellules mutantes et non mutantes.

Préparation des cultures

13. Les lignées cellulaires sont multipliées à partir de cultures mères, placées dans un milieu de culture à une densité telle que les cellules en suspension ou en monocouche poursuivront leur croissance de manière exponentielle pendant les périodes de traitement et d'expression (il convient par exemple d'éviter que les cellules qui se multiplient en monocouche arrivent à confluence).

Activation métabolique

14. Le recours à un système d'activation métabolique exogène est nécessaire en cas d'utilisation de cellules dotées d'une capacité métabolique endogène inadéquate. Le système le plus couramment utilisé, recommandé par défaut, sauf justification contraire, est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteur (S9), préparée à partir de foies de rongeurs (généralement des rats) traités avec des inducteurs enzymatiques comme l'Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) ou un mélange de phénobarbital et ß-naphthoflavone (29) (30) (31) (32). L'utilisation de ce mélange n'est pas contraire à la Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants (33) et s'est révélée aussi efficace que celle de l'Arcolor 1254 pour l'induction d'oxydases à fonction mixte (29) (31). La fraction S9 est généralement utilisée à une concentration comprise entre 1 et 2 % (v/v) mais peut être portée à 10 % v/v dans le milieu d'essai final. Le choix du type et de la concentration du système d'activation métabolique exogène ou de l'inducteur métabolique utilisé pourra dépendre de la classe des substances chimiques à tester (34) (35) (36).

Préparation du produit chimique d'essai

15. Les produits chimiques solides à tester sont dissous dans un solvant approprié puis, le cas échéant, dilués avant application (voir paragraphe 16). Avant le traitement, les produits chimiques liquides peuvent être ajoutés directement et/ou après dilution au système d'essai. Les produits gazeux ou volatils nécessitent une modification appropriée des protocoles standards, par exemple l'utilisation de récipients de culture hermétiquement clos (37) (38). Il convient de préparer les produits chimiques d'essai juste avant le traitement, à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'ils peuvent être stockés.

▼M8

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Solvants

16. Le solvant doit être choisi de manière à optimiser la solubilité des produits chimiques d'essai, sans engendrer d'effets néfastes sur la conduite de l'essai, c'est-à-dire sans modifier la croissance cellulaire, nuire à l'intégrité du produit chimique testé, réagir avec les récipients de culture ou détériorer le système d'activation métabolique. On recommande d'envisager d'abord l'utilisation d'un solvant (ou milieu de culture) aqueux chaque fois que cela est possible. L'eau et le diméthylsulfoxyde sont des exemples de solvants couramment utilisés. En règle générale, les solvants organiques ne doivent pas dépasser 1 % (v/v) et les solvants aqueux (salin ou eau) 10 % (v/v) dans le milieu de traitement final. L'emploi d'un solvant inhabituel (éthanol ou acétone, par exemple) doit être justifié par des données faisant état de sa compatibilité avec le produit chimique d'essai et le système d'essai, ainsi que de son absence de génotoxicité aux concentrations utilisées. En l'absence de telles données, il est important d'ajouter dans l'essai des témoins non traités (voir l'appendice 1) afin de démontrer que le solvant choisi n'entraîne aucun effet délétère ou mutagène.

Mesure de la cytotoxicité cellulaire et choix des concentrations d'exposition

17. Lors de la détermination de la plus forte concentration de produit chimique testé, on évitera les concentrations susceptibles de produire de fausses réponses positives, notamment celles qui engendrent une cytotoxicité excessive (voir paragraphe 20), une précipitation dans le milieu de culture (voir paragraphe 21), ou une modification marquée du pH ou de l'osmolalité (voir paragraphe 5). Si le produit chimique testé provoque une modification marquée du pH du milieu au moment de son ajout, il est possible d'ajuster le pH par tamponnage du milieu de traitement final de manière à éviter les faux résultats positifs et à maintenir des conditions de culture appropriées.

18. La concentration est sélectionnée en fonction de la cytotoxicité et d'autres considérations (voir paragraphes 20-22). Un essai préliminaire visant à évaluer la cytotoxicité peut s'avérer utile pour mieux cerner les concentrations à utiliser dans l'essai principal, mais il n'est pas obligatoire. Même si une évaluation initiale de la cytotoxicité a été effectuée, il reste indispensable de mesurer la cytotoxicité pour chaque culture dans le cadre de l'expérience principale. La cytotoxicité est évaluée au regard de la survie relative (SR), à savoir l'efficacité de clonage (EC) des cellules étalées sur plaque immédiatement après le traitement, ajustée en fonction d'une éventuelle perte de cellules en cours de traitement et fondée sur le nombre de cellules, par rapport à l'efficacité ajustée du clonage sur les témoins négatifs (à qui l'on a attribué une survie de 100 %) (voir les formules à l'appendice 2).

19. Il convient d'évaluer au moins quatre concentrations d'essai (sans compter les témoins positifs et les témoins avec solvant) remplissant les critères d'acceptabilité (cytotoxicité appropriée, nombre de cellules, etc.). Alors que l'utilisation de cultures en double exemplaires est recommandée, chacune des cultures réalisées en un seul ou plusieurs exemplaires peut être utilisée à chaque concentration d'essai. Les résultats obtenus pour chacune des répliques (cultures réalisées en plusieurs exemplaires) à une concentration donnée doivent faire l'objet de rapports distincts mais peuvent être regroupés pour l'analyse des données (17). Pour les produits chimiques dont la cytotoxicité est faible ou nulle, des niveaux de concentrations espacés d'un facteur de 2 à 3 environ conviendront généralement. En cas de cytotoxicité, les concentrations d'essai retenues doivent couvrir une plage englobant la concentration produisant une cytotoxicité et les concentrations pour lesquelles une cytotoxicité modérée, faible ou nulle est observée. De nombreux produits chimiques d'essai présentent des courbes

▼M8

concentration-réponse à forte pente et, afin de couvrir toute la plage de valeurs de la cytotoxicité ou pour étudier en détail la relation concentration-réponse, il pourra s'avérer nécessaire d'utiliser des concentrations plus rapprochées et plus de quatre concentrations, notamment dans les cas où il est nécessaire de répéter l'expérience (voir paragraphe 43). Si l'on réalise des cultures en un seul exemplaire, il peut être particulièrement important d'utiliser plus de 4 concentrations.

20. Si la concentration maximale est basée sur la cytotoxicité, la concentration la plus forte doit viser une cytotoxicité comprise entre 20 et 10 % SR. Les résultats positifs présents uniquement à une SR inférieure ou égale à 10 % doivent être interprétés avec prudence (paragraphe 43).

21. Pour les produits chimiques d'essai peu solubles qui ne sont pas cytotoxiques à des concentrations inférieures à la concentration insoluble la plus faible, la plus forte concentration analysée doit produire une turbidité ou un précipité visible à l'œil nu ou à l'aide d'un microscope inversé à la fin du traitement avec le produit chimique testé. Même si une cytotoxicité intervient au-delà de la concentration insoluble la plus faible, il est recommandé de tester une seule concentration produisant une turbidité ou un précipité visible, car de fausses réponses pourraient découler de ce précipité. À la concentration produisant un précipité, il convient de s'assurer que ce dernier n'interfère pas avec la conduite de l'essai. Il peut être utile de déterminer la solubilité dans le milieu de culture préalablement à l'essai.

22. Si aucun précipité ou aucune cytotoxicité limitante ne sont observés, la concentration d'essai maximale doit correspondre à la plus basse parmi 10 mM, 2 mg/ml ou 2 µl/ml (39) (40). Lorsque la composition du produit chimique testé n'est pas définie, par exemple dans le cas de substances de composition inconnue ou variable, de produits de réaction complexes ou de matériels biologiques (substances chimiques UVCB) (41), de produits extraits de l'environnement etc., il peut être nécessaire d'augmenter la concentration maximale (5 mg/ml par exemple), en absence de cytotoxicité suffisante, afin d'accroître la concentration de chacun des composants. Il convient toutefois de noter que ces exigences peuvent être différentes pour les produits pharmaceutiques à usage humain (42).

Témoins

23. Des témoins négatifs concomitants (voir paragraphe 16), constitués uniquement du solvant dans le milieu de traitement et testés de la même façon que les cultures traitées, doivent être inclus pour chaque condition expérimentale.

24. Des témoins positifs concomitants sont nécessaires pour démontrer la capacité du laboratoire d'identifier les mutagènes dans les conditions du protocole d'essai utilisé, ainsi que l'efficacité du système d'activation métabolique exogène, le cas échéant. Le tableau 1 ci-dessous présente des exemples de témoins positifs. D'autres substances chimiques peuvent être utilisées comme témoins positifs, si cela est justifié. Étant donné que les essais *in vitro* de génotoxicité sur cellules de mammifères sont suffisamment normalisés, les tests appliquant des traitements avec et sans activation métabolique exogène peuvent être menés en utilisant uniquement un témoin positif exigeant une activation métabolique. Dans ce cas, cette seule réponse dans un témoin positif démontrera à la fois l'activité du système d'activation métabolique et la réactivité du système d'essai. Chaque témoin positif doit être utilisé à une ou plusieurs concentrations devant normalement donner lieu à une augmentation reproductible et détectable par rapport à la valeur de fond afin de démontrer la sensibilité du système d'essai, et la réponse ne doit pas être compromise par une cytotoxicité supérieure aux limites fixées dans la présente méthode d'essai (voir paragraphe 20).

▼M8

Tableau 1

Substances de référence recommandées pour la vérification des compétences du laboratoire et pour la sélection des témoins positifs

Condition d'activation métabolique	Locus	Substance chimique et N° CAS.
en l'absence d'une activation exogène	*Hprt*	Méthanesulfonate d'éthyle [n° CAS 62-50-0] Ethylnitrosourée [n° CAS 759-73-9] Oxyde de nitro-4 quinoléine [n° CAS 56-57-5]
	XPRT	Streptonigrine [n° CAS 3930-19-6] Mitomycine C [n° CAS 50-07-7]
en présence d'une activation exogène	*Hprt*	Méthyl-3 cholantrène [n° CAS 56-49-5] Diméthyl7,12 benzanthracène [n° CAS 57-97-6] Benzo[a]pyrène [n° CAS 50-32-8]
	XPRT	Benzo[a]pyrène [n° CAS 50-32-8]

MODE OPÉRATOIRE

Traitement avec le produit chimique testé

25. Les cellules en prolifération sont traitées avec le produit chimique d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique. La durée d'exposition doit être suffisante (de 3 à 6 heures sont généralement efficaces).

26. Le nombre minimal de cellules utilisées pour chaque culture d'essai (témoin et traitée) à chaque étape de l'essai doit être basé sur la fréquence de mutants spontanés. Il est conseillé en général de traiter et repiquer suffisamment de cellules pour préserver 10 mutants spontanés dans chaque culture à toutes les phases de l'essai (17). La fréquence des mutants spontanés varie en général entre 5 et 20×10^{-6}. Avec une fréquence de mutants spontanés de 5×10^{-6} et pour entretenir un nombre suffisant de mutants spontanés (10 ou plus) même pour les cultures traitées à des concentrations causant une cytotoxicité de 90 % pendant le traitement (10 % de SR), il est nécessaire de traiter au moins 20×10^{6} cellules. Il faut en outre qu'un nombre suffisant de cellules (jamais moins de 2 millions) soient cultivées durant la période d'expression et étalées sur plaque pour la sélection des mutants (17).

Délai d'expression phénotypique et mesure de la fréquence des mutants

27. À l'issue de la période de traitement, les cellules sont cultivées de façon à permettre l'expression phénotypique de mutants. Un minimum de 7 à 9 jours suffit en général à l'expression phénotypique presque optimale des mutants Hprt et xprt nouvellement introduits (43) (44). Durant cette période, les cellules sont régulièrement mises en sous-culture pour préserver leur croissance exponentielle. Après l'expression phénotypique, les cellules sont à nouveau étalées sur plaque dans le milieu avec et sans agent sélectif (6-thioguanine) afin de déterminer le nombre de mutants et l'efficacité de clonage au moment de la sélection, respectivement. Cette opération peut se faire avec des boîtes pour cultures monocouche ou avec des plaques micropuits pour cellules en suspension. S'agissant de la sélection des mutants, il convient d'étaler sur des plaques les cellules suivant une densité qui assure la récupération optimale des mutants (en évitant notamment la coopération métabolique) (17). On incube les plaques pendant une durée appropriée à une croissance optimale des colonies (par exemple de 7 à 12 jours), puis on compte les colonies. On corrige le nombre de colonies de mutants par l'efficacité de clonage au moment de la sélection des mutants pour obtenir la fréquence des mutants (voir l'appendice 2 pour les formules).

▼M8

Compétence du laboratoire

28. Afin d'acquérir une expérience suffisante de l'essai avant de l'utiliser en routine, le laboratoire doit avoir réalisé une série d'expériences avec des substances chimiques positives de référence agissant selon des mécanismes variés (au moins une avec activation métabolique et une sans activation métabolique, sélectionnées parmi les substances chimiques énumérées au tableau 1) et avec plusieurs témoins négatifs (en utilisant divers solvants/véhicules). Ces réponses de témoins positifs et négatifs doivent être cohérentes par rapport à la littérature. Cette exigence ne s'applique pas aux laboratoires possédant déjà une expérience, c'est-à-dire qui disposent d'une base de données historiques telle que définie aux paragraphes 30 à 33.

29. Une sélection de substances chimiques utilisées comme témoins positifs (voir tableau 1) doit être testée en l'absence et en présence d'une activation métabolique, l'objectif étant de démontrer que le laboratoire possède la compétence nécessaire pour détecter des produits chimiques mutagènes, de déterminer l'efficacité du système d'activation métabolique et de prouver l'adéquation des conditions de croissance cellulaire durant le traitement, l'expression phénotypique et la sélection des mutants, ainsi que l'adéquation des procédures d'évaluation. Il conviendra de définir une plage de concentrations des substances chimiques sélectionnées qui permette d'obtenir des augmentations reproductibles et liées à la concentration par rapport aux valeurs de fond, afin de démontrer la sensibilité et la plage dynamique du système d'essai.

Données des témoins historiques

30. Le laboratoire doit établir:

— une plage et une distribution des témoins positifs historiques,

— une plage et une distribution des témoins négatifs (non traités, avec solvant) historiques.

31. Lors de l'acquisition initiale de données en vue d'établir une distribution des témoins négatifs historiques, les données des témoins négatifs concomitants doivent être cohérentes avec les données publiées (22). Puis, à mesure que de nouvelles données expérimentales viennent étoffer la plage de distribution des témoins, les données des témoins négatifs concomitants doivent idéalement se situer dans les limites de contrôle à 95 % de cette distribution (17) (45) (46).

32. La base des données historiques du laboratoire relatives aux témoins négatifs doit à l'origine être constituée à partir d'au moins 10 expériences, sachant qu'il serait préférable qu'elle en compte au moins 20, réalisées dans des conditions expérimentales similaires. Les laboratoires doivent avoir recours à des méthodes de contrôle de la qualité telles que des graphiques statistiques [cartes C ou cartes X-barre, par exemple (47)], afin de déterminer la variabilité de leurs données de témoins positifs et négatifs et de démontrer leur maîtrise de la méthodologie (46). On trouve dans la littérature (45) d'autres recommandations sur la façon de constituer et d'utiliser ces données historiques (critères d'inclusion et d'exclusion des données dans la base et critères d'acceptabilité pour une expérimentation donnée).

33. Les données des témoins négatifs désignent les fréquences des mutants issus de cultures réalisées en un seul exemplaire, ou de préférence de cultures répliquées, comme décrit au paragraphe 23. Les témoins négatifs concomitants se situent idéalement dans les limites de contrôle à 95 % de la distribution des données historiques des témoins négatifs contenues dans la base de données du laboratoire (17) (45) (46). Lorsque les données des témoins négatifs concomitants se situent en dehors des limites de contrôle à 95 %, leur inclusion dans la distribution des témoins historiques peut être acceptable à condition que ces données ne soient pas exagérément extrêmes et qu'il soit prouvé que le système d'essai est «sous contrôle» (voir ci-dessus) et qu'il n'y a pas eu de défaillance technique ou d'erreur humaine.

▼M8

34. Toute modification du protocole expérimental doit être étudiée en termes de cohérence avec les bases de données des témoins historiques existantes du laboratoire. Toute incohérence majeure doit conduire à l'établissement d'une nouvelle base de données des témoins historiques.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Présentation des résultats

35. La présentation des résultats doit inclure toutes les données nécessaires au calcul de la cytotoxicité (exprimée en SR). Les données, tant pour les cultures traitées que témoins, doivent inclure le nombre de cellules à la fin du traitement, le nombre de cellules étalées sur plaque immédiatement après le traitement, et le nombre de colonies (ou de puits sans colonies pour la méthode utilisant des plaques micropuits). Il convient d'exprimer la SR pour chaque culture en pourcentage du témoin concomitant contenant le solvant (Voir les définitions à l'appendice 1).

36. La présentation des résultats doit également inclure toutes les données nécessaires au calcul de la fréquence des mutants. Les données, tant pour les cultures traitées que témoins, doivent inclure: (1) le nombre de cellules étalées sur plaque avec et sans agent sélectif (au moment où les cellules sont étalées sur plaque pour la sélection des mutants), et (2) le nombre de colonies (ou le nombre de puits sans colonies pour la méthode utilisant des micropuits) sur les plaques avec et sans agent sélectif. On corrige le nombre de colonies de mutants (sur les plaques avec agent sélectif) par l'efficacité de clonage (sur les plaques sans agent sélectif) pour obtenir la fréquence des mutants. Il convient d'exprimer la fréquence des mutants en nombre de cellules mutantes par million de cellules viables (Voir les définitions à l'appendice 1).

37. Les données seront présentées séparément pour chaque culture. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux.

Critères d'acceptabilité

38. L'acceptation de l'essai repose sur les critères suivants:

— Les données relatives aux témoins négatifs concomitants sont considérées comme pouvant être ajoutées à la base de données des témoins négatifs historiques du laboratoire (voir paragraphe 33).

— Les témoins positifs concomitants (voir paragraphe 24) doivent induire des réponses compatibles avec celles générées dans la base de données des témoins positifs historiques et produire une augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins négatifs concomitants.

— Deux conditions expérimentales (à savoir avec et sans activation métabolique) ont été testées, à moins que l'une d'entre elles ait abouti à des résultats positifs (voir paragraphe 25).

— Un nombre adéquat de cellules et de concentrations sont analysables (voir paragraphes 26, 27 et 19).

— Les critères de sélection de la concentration maximale sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 20, 21 et 22.

Évaluation et interprétation des résultats

39. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si, dans les conditions expérimentales étudiées:

▼M8

— au moins une des concentrations d'essai présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant,

— un test de tendance approprié montre que l'augmentation est liée à la concentration,

— des résultats se situent à l'extérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson, par exemple; voir paragraphe 33).

Lorsque tous ces critères sont remplis, le produit chimique d'essai est considéré comme capable d'induire des mutations génétiques dans les cellules de mammifères en culture dans ce système d'essai. Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont disponibles dans la littérature (46) (48).

40. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si, dans toutes les conditions expérimentales étudiées:

— aucune concentration d'essai ne présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant;

— un test de tendance approprié montre qu'il n'y a pas d'augmentation liée à la concentration;

— l'intégralité des résultats se situe à l'intérieur de la distribution des données des témoins négatifs historiques (limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson, par exemple; voir paragraphe 33).

Le produit chimique d'essai est alors considéré comme incapable d'induire des mutations génétiques dans les cellules de mammifères en culture dans ce système d'essai.

41. Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse clairement positive ou négative.

42. Lorsque la réponse n'est ni clairement négative ni clairement positive, tel que décrit ci-dessus, ou en vue d'établir la signification biologique d'un résultat, les données doivent être soumises à un jugement d'expert et/ou des investigations plus poussées. Il peut être utile d'examiner des cellules supplémentaires (le cas échéant) ou de répéter l'expérience, éventuellement dans des conditions expérimentales modifiées (espacement des concentrations, autres conditions d'activation métabolique [concentration de S9 ou origine de S9], par exemple).

43. Dans de rares cas, même après de nouvelles investigations, l'ensemble de données ne permettra pas de conclure que les résultats sont positifs ou négatifs. La réponse au produit chimique d'essai devra alors être considérée comme équivoque (et donc potentiellement aussi bien positive que négative).

Rapport d'essai

44. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Produit chimique d'essai:

— source, numéro de lot, date limite d'utilisation, si disponibles;

— stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue;

— solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant, si elles sont connues;

— mesure du pH, de l'osmolalité et de la précipitation dans le milieu de culture auquel le produit chimique d'essai a été ajouté, le cas échéant.

▼**M8**

Substance mono-constituant:

— apparence physique, hydrosolubilité, autres propriétés physico-chimiques;

— identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges:

— caractérisée, autant que possible par exemple l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence quantitative et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants.

Solvant:

— justification du choix du solvant;

— pourcentage de solvant présent dans le milieu de culture final.

Cellules:

Pour les cultures mères du laboratoire:

— type et source des lignées cellulaires;

— nombre de repiquages, le cas échéant, et historique au laboratoire;

— caractéristiques du caryotype et/ou nombre modal de chromosomes;

— méthodes d'entretien des cultures cellulaires;

— absence de mycoplasmes;

— temps de doublement des cellules.

Conditions de l'essai:

— justification du choix des concentrations et du nombre de cultures, y compris données concernant la cytotoxicité et les limites de solubilité, par exemple;

— composition du milieu, concentration de CO2, degré d'humidité;

— concentration du produit chimique d'essai sous la forme de sa concentration finale dans le milieu de culture (par exemple en µg ou mg/ml ou mM du milieu de culture);

— concentration (et/ou volume) de solvant et de produit chimique d'essai ajoutés au milieu de culture;

— température d'incubation;

— temps d'incubation;

— durée du traitement;

— densité des cellules pendant le traitement;

— type et composition du système d'activation métabolique (source du S9, méthode de préparation du mélange S9, concentration ou volume de mélange S9 et de S9 dans le milieu de culture final, contrôles de la qualité du S9);

— substances témoins positives et négatives, concentrations finales pour chacune des conditions de traitement;

▼**M8**

— durée de la période d'expression (avec le nombre de cellules déposées et de repiquages et les programmes de nutrition, le cas échéant);

— identité de l'agent sélectif et sa concentration;

— critères d'acceptabilité des essais;

— méthodes utilisées pour dénombrer les cellules viables et les cellules mutantes;

— méthodes utilisées pour mesurer la cytotoxicité;

— toute information supplémentaire concernant la cytotoxicité et la méthode utilisée;

— temps d'incubation après étalement sur une plaque;

— critères pour conclure que l'étude est positive, négative ou équivoque;

— méthodes utilisées pour déterminer le pH, l'osmolalité et la précipitation.

Résultats:

— nombre de cellules exposées et nombre de cellules repiquées pour chaque culture;

— mesures de la cytotoxicité et autres observations le cas échéant;

— signes de précipitation et moment de la détermination;

— nombre de cellules étalées sur plaque dans un milieu sélectif et dans un milieu non sélectif;

— nombre de colonies dans un milieu non sélectif et nombre de colonies résistantes dans un milieu sélectif, et fréquences de mutants correspondantes;

— relation concentration-réponse, si possible;

— données relatives aux témoins négatifs (solvant) et positifs (concentrations et solvants) concomitants;

— données relatives aux témoins négatifs (solvant) et positifs historiques, y compris ordres de grandeur, moyennes, écarts-types et intervalle de confiance (par exemple 95 %) et nombre de données;

— analyses statistiques (pour chaque culture et chaque lot de réplicats, le cas échéant), et valeurs P le cas échéant.

Discussion des résultats.

Conclusion.

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Publications Hygiène et sécurité de l'environnement, Série sur les essais et les évaluations N° 2XX, OCDE, Paris.

(2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. et Tindall K.R. (Eds.). (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, ColdSpringHarbor Laboratory, New York, New York.

▼**M8**

(3) Chu E.H.Y. et Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., États-Unis, 61, 1306-1312.

(4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. et Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagen. Mutagen., 4, 394-403.

(5) Aaron C.S. et Stankowski L.F. Jr. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, 121-128.

(6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. et Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, 235-239.

(7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. et Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program.Mutation Res., 196, 17-36.

(8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. et Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.

(9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. et Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297-305.

(10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations, Environ. Mutagen., 8, 789-886.

(11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. et Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutation Res., 49, 439-452.

(12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. et Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634, 177-183.

(13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., et Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and rRlative Predictivity. Mutation. Res., 584, 1–256.

(14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. et Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.

(15) Liber H.L., Yandell D.W. et Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9-17.

(16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. et Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133-147.

▼**M8**

(17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. et Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based Upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds), Cambridge University Press, pp. 66-101.

(18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., et Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, Mutation Res., 86, 193-214.

(19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, Mutation Res., 85, 165-175.

(20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff, R., et Hsie, A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2-Transformed Cells, Mol. Cell. Biol., 4, 1411-1415.

(21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., et Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. Proc Natl Acad Sci., 83(24): 9616–9620.

(22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A.et Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscrit en préparation).

(23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. et Stokes W. Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, 261-287.

(24) Rosen M.P., San R.H.C. et Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299-305.

(25) Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. et de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 83-90.

(26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. et Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.

(27) Ames B.N., McCann J. et Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347-364.

(28) Maron D.M. et Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173, 215.

(29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. et Wolf R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen. 7, 175-177.

(30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. et Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. et Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

▼**M8**

(31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. et Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. Pathol. Pathol. *Toxicol*., 4, 55-65.

(32) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. et Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28, 51-59.

(33) PNUE. (2001). Convention de Stockholm sur les Polluants Organiques Persistants, Programme des Nations Unies pour l'environnement (PNUE). Disponible à l'adresse suivante: [http://www.pops.int/.html].

(34) Tan E.-L. et Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cγ Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT system. Mutation Res., 84, 147-156.

(35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Mammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. Environ. Mol. Mutation Res., 4, 7-18.

(36) Li A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. Environ. Mol. Mutation Res., 4, 7-18.

(37) Krahn D.F., Barsky F.C. et McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice R.R., Costa D.L., Schaich K.M. (Eds.). (Eds) Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.

(38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. et Brooks A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5, 795-801.

(39) OCDE (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). Disponible sur demande auprès de l'Organisation de coopération et de développement économiques.

(40) Brookmire L., Chen J.J. et Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, Environ. Mol. Mutation Res., 54, 36-43. Mol. Mutation Res., 54, 36-43.

(41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,

(42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Available at: [https://federalregister.gov/a/2012-13774].

(43) O'Neill J.P., et Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-Thioguranine Resistance in Chinese Hamster Ovary Cells (CHO/HGPRT system), Mutation Res., 59, 109-118.

(44) Chiewchanwit T., Ma H., el Zein R., Hallberg L. et Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. Mutation Res., 1335(2):121-8.

▼**M8**

(45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus HJ. et Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723, 87-90.

(46) OCDE.(2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No 199), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O. et Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(48) Fleiss J. L., Levin B. et Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Troisième Edition, New York: John Wiley & Sons.

▼**M8**

Appendice 1

DÉFINITIONS

Concentrations: désigne les concentrations finales du produit chimique d'essai dans le milieu de culture.

Cytotoxicité: pour les essais visés par la présente méthode d'essai, la cytotoxicité correspond à une baisse de la survie relative des cellules traitées par rapport au témoin négatif (voir paragraphe spécifique).

Délai d'expression phénotypique: délai après traitement au bout duquel l'altération génique est fixée dans le génome et tous les produits géniques préexistants sont déplétés au point que le caractère phénotypique est modifié.

Efficacité de clonage: pourcentage de cellules étalées sur plaque à une faible densité qui sont capables de se développer pour former une colonie dénombrable.

Fréquence des mutants (FM): nombre de colonies de mutants observées divisé par le nombre de cellules étalées sur plaque dans un milieu sélectif, corrigé de l'efficacité (ou viabilité) du clonage au moment de la sélection.

Génotoxique: terme générique qualifiant tous les types de lésions de l'ADN ou des chromosomes, tels que les cassures, adduits, remaniements, mutations ou aberrations chromosomiques et aneuploïdies. Tous les types d'effets génotoxiques n'entraînent pas nécessairement de mutations ou de lésions chromosomiques stables.

Mélange S9: mélange de fraction S9 de foie et de cofacteurs nécessaires à l'activité des enzymes métaboliques.

Milieu HAT: milieu composé d'hypoxanthine, d'aminoptérine et de thymidine, qui sert à nettoyer les mutants Hprt.

Milieu MPA: milieu composé de xanthine, d'adénine, de thymidine, d'aminoptérine et d'acide mycophénolique, qui sert à nettoyer les mutants Xprt.

Mutagène: qui produit une modification héréditaire portant sur une ou plusieurs séquences de paires de bases d'ADN génique, ou sur la structure de chromosomes (aberrations chromosomiques).

Mutagènes décalant le cadre de lecture: produits chimiques entraînant l'addition ou la délétion d'une ou de plusieurs paires de bases dans la molécule d'ADN.

Mutagènes provoquant la substitution de paires de bases: produits chimiques qui entraînent le remplacement d'une ou plusieurs paires de bases de l'ADN.

Mutation directe: mutation de gène de la forme parentale en une forme mutante, qui engendre une modification ou une perte de l'activité enzymatique ou de la fonction de la protéine codée.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Prolifération cellulaire: augmentation du nombre de cellules résultant de la division cellulaire mitotique.

▼**M8**

Recombinaison mitotique: durant la mitose, recombinaison entre chromatides homologues pouvant induire des cassures double brin de l'ADN ou une perte d'hétérozygotie.

Survie relative (SR): la SR sert à mesurer la cytotoxicité liée à un traitement. Elle correspond à l'efficacité de clonage (EC) des cellules étalées sur plaques immédiatement après le traitement, ajustée en fonction d'une éventuelle perte de cellules en cours de traitement, par rapport à l'efficacité de clonage dans les témoins négatifs (à qui l'on attribue une survie de 100 %).

S9 liver fractions: supernatant of liver homogenate after 9 000g centrifugation, i.e. raw liver extract

Témoin avec solvant: terme générique désignant les cultures témoins recevant uniquement le solvant utilisé pour dissoudre le produit chimique d'essai.

Témoins non traités: cultures ne recevant aucun traitement (ni produit chimique d'essai ni solvant) mais préparées parallèlement et de la même façon que les cultures exposées au produit chimique d'essai.

UVCB: substances chimiques de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes et matériels biologiques

▼M8

Appendice 2

FORMULES POUR L'ÉVALUATION DE LA CYTOTOXICITÉ ET DE LA FRÉQUENCE DES MUTANTS

La cytotoxicité est évaluée par la survie relative (SR), c'est-à-dire l'efficacité de clonage (EC) des cellules étalées sur plaque immédiatement après le traitement, ajustée en fonction d'une éventuelle perte de cellules en cours de traitement, par rapport à l'efficacité ajustée du clonage dans les témoins négatifs (à qui l'on attribue une survie de 100 %) (voir la formule de SR ci-après).

L'EC ajustée pour une culture traitée par un produit chimique d'essai est calculée comme suit:

$$\text{EC ajustée} = \frac{\text{Nombre de cellules ila fin du traitement}}{\text{Nombre de cellules au début du traitement}}$$

La SR pour une culture traitée par un produit chimique d'essai est calculée comme suit:

$$\text{SR} = \frac{\text{EC ajustée pour la culture traitée}}{\text{EC ajustée pour le témoin avec solvant}} \times 100$$

La fréquence des mutants correspond à l'efficacité de clonage de colonies de mutants dans un milieu sélectif divisée par l'efficacité de clonage dans un milieu non sélectif mesurée pour la même culture au moment de sélection.

$$\text{Fréquence des mutants} = \frac{\text{Efficacité de clonage des colonies de mutants dans un milieu sélectif}}{\text{Efficacité de clonage en milieu non sélectif}}$$

Lorsque des plaques sont utilisées pour renforcer l'efficacité de clonage:

EC = Nombre de colonies / Nombre de cellules étalées sur plaque.

Lorsque des plaques micropuits sont utilisées pour renforcer l'efficacité de clonage:

Le nombre de colonies par puits sur les plaques micropuits obéit à la loi de Poisson.

EC = -LnP(0) / Nombre de cellules étalées sur plaque par puits

Où -Ln P(0) est le nombre probable de puits vides parmi les puits ensemencés et correspond à la formule suivante:

LnP(0) = -Ln (nombre de puits vides / nombre de puits ensemencés)

▼M7

_____

_____

_____

▼B

B.21. **TESTS DE TRANSFORMATION SUR CELLULES DE MAMMIFÈRE IN VITRO**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Voir introduction générale, partie B.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Néant.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Des systèmes de culture de cellules de mammifère peuvent être utilisés pour déceler des modifications phénotypiques *in vitro* induites par des substances chimiques associées à une transformation maligne *in vivo*. Parmi les cellules les plus fréquemment utilisées figurent C3H10T'$^{1}/_{2}$, 3T3, SHE, rat Fisher; les tests sont fondés sur des modifications de la morphologie cellulaire, la formation des foyers ou des modifications liées à la croissance ou non dans un agar semi-solide. Il existe des systèmes moins fréquemment utilisés qui décèlent d'autres modifications physiologiques ou morphologiques dans les cellules a l'issue d'une exposition à des cancérogènes chimiques. Aucun des critères analysés dans ces tests *in vitro* n'a de relation mécanistique établie avec le cancer. Certains systèmes de tests sont capables de déceler des promoteurs de tumeur. On peut déterminer la cytotoxicité en mesurant l'effet de la substance d'essai sur les aptitudes à former une colonie (efficacité de clonage) ou sur les taux de croissance des cultures. La mesure de la cytotoxicité a pour but de déterminer si l'exposition à la substance d'essai a été toxicologiquement significative mais ne peut servir à calculer la fréquence des transformations dans toutes les épreuves, étant donné que certaines de celles-ci peuvent nécessiter une incubation prolongée et/ou un réensemencement.

1.5. CRITÈRE QUALITATIF

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparations

Cellules

Suivant l'épreuve de transformation effectuée, diverses lignées cellulaires ou cellules primaires peuvent être utilisées. L'investigateur veillera à ce que les cellules utilisées pour l'épreuve présentent la modification phénotypique adéquate après exposition à des cancérogènes connus et à ce que la preuve de la validité et de la fiabilité de l'essai effectué dans le laboratoire de l'investigateur soient étayées par des documents.

Milieu

On utilisera des milieux et des conditions d'essai convenant à la méthode de transformation utilisée.

▼B

Substance d'essai

Les substances d'essai peuvent être soit préparées dans des milieux de culture, soit dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés avant le traitement des cellules. La concentration finale du véhicule dans le milieu de culture n'affectera ni la viabilité des cellules, ni le taux de croissance, ni l'incidence de transformation.

Activation métabolique

Les cellules sont exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système approprié d'activation métabolique de mammifère. Si l'on utilise des types de cellules ayant une activité métabolique intrinsèque, la nature de l'activité sera reconnue comme appropriée à la classe chimique testée.

Conditions d'essai

Utilisation de témoins positifs et négatifs

Des témoins positifs utilisant une substance à action directe et une substance nécessitant une activation métabolique seront inclus dans chaque expérience: un témoin négatif (véhicule) sera également utilisé.

Les substances ci-après peuvent, par exemple, être utilisées comme témoins positifs:

— substances chimiques à action directe:

  — méthanesulfonate d'éthyle,

  — μ-propiolactone,

— substances nécessitant une activation métabolique:

  — 2-acétylaminofluorène,

  — 4-diméthylaminoazobenzène,

  — 7,12-diméthylbenzo(a)anthracène.

Si cela se justifie, un témoin positif supplémentaire appartenant à la même classe chimique que la substance testée devrait être inclus.

Concentrations d'exposition

Plusieurs concentrations de la substance d'essai devraient être utilisées. Ces concentrations devraient produire un effet toxique en rapport avec la concentration, la concentration maximale produira un faible taux de survie, la concentration minimale un taux de survie voisin de celui observé pour le témoin négatif. Les substances relativement insolubles dans l'eau seront testées jusqu'à leur limite de solubilité par des méthodes appropriées. Dans le cas de substances non toxiques très solubles dans l'eau, la concentration maximale devrait être déterminée cas par cas.

▼B

Conduite de l'essai

Les cellules sont exposées pendant un laps de temps adéquat dépendant du système cellulaire utilisé, et ceci peut impliquer un nouveau traitement assorti d'un changement de milieu (et si nécessaire, un nouveau mélange d'activation métabolique) si l'exposition est prolongée. Les cellules n'ayant pas une activité métabolique intrinsèque suffisante devraient être exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique approprié. À l'issue de la période d'exposition, les cellules sont lavées de manière à éliminer la substance testée et mises en culture dans des conditions permettant l'apparition du phénotype transformé étudié et l'incidence de cette transformation est déterminée. Tous les résultats sont confirmés au cours d'une expérience indépendante.

2. **RÉSULTATS**

Les résultats devraient être présentés sous la forme de tableaux et peuvent être combinés différemment suivant la méthode utilisée, par exemple comptage par boîte, boîtes positives ou nombre de cellules transformées. Le cas échéant, le taux de survie sera exprimé en pourcentage des taux témoins; la fréquence de transformation correspondra au nombre de cellules transformées par nombre de survivantes. Les résultats devraient être évalués par des méthodes statistiques appropriées.

3. **RAPPORT**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

— type de cellule utilisée, nombre de cultures cellulaires, méthodes d'entretien des cultures cellulaires,

— conditions d'essai: concentration de la substance d'essai, véhicule utilisé, temps d'incubation, durée et fréquence du traitement, densité cellulaire durant le traitement, type de système d'activation métabolique exogène utilisé, témoins positifs et négatifs, spécification du phénotype étudié, système sélectif utilisé (le cas échéant), justification du choix des doses,

— méthode utilisée pouf compter les cellules viables et transformées,

— évaluation statistique,

— discussion des résultats,

— interprétation des résultats.

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

▼M8

B.22. ESSAI DE MUTATION LÉTALE DOMINANTE CHEZ LE RONGEUR

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 478 (2016) de l'OCDEpour les essais de produits chimiques. Les méthodes d'essai sont régulièrement mises à jour à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences réglementaires et de considérations relatives au bien-être des animaux. La présente version modifiée de la méthode d'essai reflète plus de trente années d'expérience de cet essai et tient compte des possibilités de l'intégrer ou de le combiner à d'autres essais de toxicité, notamment pour le développement, la reproduction ou encore des essais de génotoxicité; cependant, étant donné les limitations de l'essai et le grand nombre d'animaux utilisés, cet essai n'a pas vocation à être utilisé en première intention, mais plutôt comme méthode d'essai supplémentaire quand il n'existe pas d'alternative pour satisfaire les exigences réglementaires. Combiner différents essais de toxicité permet potentiellement d'épargner un grand nombre d'animaux utilisés dans les tests. L'ODE a élaboré un document qui fournit des éléments d'information concis sur les essais de toxicologie génétique et donne un aperçu des récents changements qui ont été apportés aux lignes directrices de toxicité génétique de l'OCDE(1).

2. L'essai de mutation létale dominante a pour but de détecter si certains produits chimiques engendrent des mutations résultant d'aberrations chromosomiques dans les cellules germinales. En outre, l'essai de mutation létale dominante se prête bien à l'évaluation de la génotoxicité car, malgré des variations entre les espèces, les facteurs du métabolisme *in vivo*, la pharmacocinétique et les processus de réparation de l'ADN sont actifs et contribuent aux réponses. L'apparition d'une mutation létale dominante à la suite d'une exposition à un produit chimique d'essai indique que cette substance a affecté le tissu germinal de l'animal étudié.

3. Les mutations létales dominantes provoquent la mort de l'embryon ou du fœtus. L'apparition d'une mutation létale dominante à la suite d'une exposition à un produit chimique indique que cette substance a affecté les cellules germinales de l'animal étudié.

4. Un essai de mutation létale dominante permet de confirmer les résultats positifs d'essais utilisant des indicateurs somatiques *in vivo*, et constitue un indicateur pertinent pour prédire le risque chez l'homme de pathologies génétiques transmises par le biais des cellules germinales. Cependant cet essai requiert l'utilisation d'un grand nombre d'animaux et mobilise beaucoup de temps de travail, le rendant onéreux et fastidieux à mener. Étant donné la fréquence importante de mutations dominantes létales spontanées, la sensibilité de l'essai pour détecter de faibles augmentations dans la fréquence des mutations est généralement limitée.

5. Les définitions des termes clés figurent à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

6. La plupart du temps, l'essai est conduit sur des souris (2) (3) (4), mais d'autres espèces, telles que le rat (5) (6) (7) (8), peuvent être utilisées si cela est justifié sur le plan scientifique. Si, en général, les mutations létales dominantes résultent d'aberrations chromosomiques majeures (anomalies structurales et numériques) (9) (10) (11), l'éventualité de mutations génétiques ne peut être écartée. Une mutation létale dominante est une mutation

▼M8

qui se produit dans une cellule germinale, ou qui se fixe après la fécondation dans le jeune embryon, et qui n'entraîne pas de dysfonctionnement du gamète, mais qui est mortelle pour l'œuf fécondé ou pour l'embryon en cours de développement.

7. Des mâles identifiés sont accouplés successivement avec des femelles vierges, à des intervalles appropriés. Le nombre d'accouplements après le traitement dépend de l'objectif final de l'étude de mutation létale dominante (paragraphe 23) et doit garantir l'évaluation des mutations létales dominantes à toutes les phases de maturation des cellules germinales mâles (12).

8. Cet essai n'est pas pertinent s'il est prouvé que le produit chimique ou son/ses métabolite(s), n'atteindront pas le testicule.

PRINCIPE DE L'ESSAI

9. En général, des animaux mâles sont exposés à un produit chimique d'essai par une voie d'exposition idoine puis accouplés avec des femelles vierges non traitées. Différents types de cellules germinales peuvent être testées en utilisant différents intervalles d'accouplement. À la suite de l'accouplement, les femelles sont euthanasiées après une période de temps appropriée et leur utérus est examiné afin de déterminer le nombre d'embryons implantés, ainsi que celui des embryons vivants et morts. Pour déterminer la létalité dominante d'un produit chimique d'essai, le nombre d'embryons implantés vivants par femelle dans le groupe traité est comparé au nombre d'embryons implantés vivants par femelle dans le groupe témoin véhicule/solvant. L'augmentation du nombre d'embryons implantés morts par femelle dans le groupe traité par rapport au groupe témoin reflète la perte après implantation causée par le produit chimique d'essai. La perte après implantation est calculée en déterminant le rapport du nombre d'embryons implantés morts au nombre total d'embryons implantés dans le groupe traité et en le comparant au rapport du nombre d'embryons implantés morts au nombre total d'embryons implantés dans le groupe témoin. La perte avant implantation peut être évaluée en retranchant au nombre de corps jaunes le nombre total d'embryons implantés, soit le nombre total d'implants par femelle dans le groupe traité et dans le groupe témoin.

VÉRIFICATION DES COMPÉTENCES DU LABORATOIRE

10. La compétence à mener cet essai est établie sur la base d'informations démontrant l'aptitude à reproduire des fréquences de mutations létales dominantes à partir de données publiées (par exemple (13) (14) (15) (16) (17) (18)) avec les substances chimiques utilisées comme témoins positifs (réponses faibles comprises) telles que celles énumérées dans le tableau 1, et les témoins contenant le véhicule, et à obtenir des fréquences de témoin négatif cohérentes avec la plage de données acceptable relatives aux témoins (voir références ci-dessus) ou avec la distribution des données des témoins historiques du laboratoire, le cas échéant.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Préparations

Choix des espèces animales

11. Il convient d'employer des animaux sains et sexuellement matures issus de souches de laboratoire courantes. Les souris sont habituellement utilisées, mais les rats peuvent également convenir. Toute autre espèce appropriée de mammifère peut être employée à condition qu'une justification scientifique de ce choix soit donnée dans le rapport.

▼M8

Conditions d'encagement et d'alimentation des animaux

12. Pour les rongeurs, la température de l'animalerie doit être maintenue à 22 °C (±3 °C). L'humidité relative, qui est idéalement de 50 à 60 %, doit atteindre au moins 40 % et de préférence ne pas dépasser 70 %, sauf durant le nettoyage du local. On dispense un éclairage artificiel faisant alterner des séquences de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire des animaux est le régime classique de laboratoire avec eau potable à volonté. Le choix des aliments peut être influencé par la nécessité d'assurer une bonne incorporation du produit chimique dans la nourriture si l'administration se fait par cette voie. Avant le traitement ou l'accouplement, les rongeurs doivent être mis en cage par petits groupes (de cinq maximum) du même sexe si aucun comportement agressif n'est à craindre ou n'est observé, de préférence dans des cages solides dotées d'un enrichissement environnemental approprié. Les animaux peuvent être encagés individuellement si cela est justifié sur le plan scientifique.

Préparation des animaux

13. Des animaux adultes mâles et femelles, sains et sexuellement matures, sont répartis au hasard entre le groupe témoin et les groupes traités. Chaque animal est identifié individuellement selon une méthode sans cruauté, la moins invasive possible (par exemple, baguage, étiquetage, pose d'une puce électronique ou identification biométrique, en évitant l'entaillage des oreilles ou la phalangectomie) et gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire. Les cages doivent être placées de manière à réduire au minimum l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats. Il convient d'éviter toute contamination croisée entre le témoin positif et le produit chimique d'essai. Au début de l'étude, la variation pondérale des animaux doit être minimale et ne pas dépasser ±20 % du poids moyen de chaque sexe.

Préparation des doses

14. Lorsque les produits chimiques d'essai sont solides, ils sont dissous ou mis en suspension dans des solvants ou des véhicules appropriés, ou incorporés aux aliments ou à l'eau de boisson avant d'être administrés aux animaux. Les produits chimiques liquides peuvent être administrés directement ou dilués avant d'être administrés. En cas d'exposition par inhalation, les produits chimiques d'essai peuvent être administrés sous forme de gaz, de vapeur ou d'aérosol solide ou liquide, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. On utilisera des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage et définissent les conditions de stockage appropriées.

Conditions de l'essai

Solvant/véhicule

15. Le solvant/véhicule ne doit pas produire d'effets toxiques aux doses utilisées, ni pouvoir réagir avec le produit chimique d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données de référence faisant état de leur compatibilité. On recommande d'envisager d'abord l'utilisation d'un solvant/véhicule aqueux chaque fois que c'est possible. Parmi les exemples de solvants/véhicules compatibles couramment utilisés figurent notamment l'eau, le sérum physiologique, les solutions de méthylcellulose, les solutions de carboxyméthylcellulose sodique, l'huile d'olive et l'huile de maïs.

Témoins positifs

16. Des animaux témoins positifs sont toujours inclus simultanément dans l'essai, à moins que le laboratoire n'ait déjà démontré ses compétences dans la conduite de l'essai et n'ait mené le test en routine récemment (par exemple dans les cinq dernières années). Toutefois, il n'est pas nécessaire de leur administrer le produit témoin positif par la même voie que celle du produit

▼M8

chimique d'essai, ni de réaliser des prélèvements à chaque intervalle d'accouplement. Les substances utilisées comme témoins positifs doivent induire des mutations létales dominantes de façon fiable et dans les mêmes conditions que l'essai. À l'exception du traitement administré, les animaux des groupes témoins sont traités de la même manière que ceux des groupes de traitement.

17. Les doses des substances chimiques utilisées comme témoins positifs sont sélectionnées de manière à produire des effets faibles ou modérés qui permettent d'évaluer de manière critique les performances et la sensibilité de l'essai, mais qui induisent systématiquement des effets létaux dominants. Des exemples de substances chimiques utilisés comme témoins positifs, et des doses idoines, figurent au tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1

Exemples de substances chimiques utilisées comme témoins positifs

Substance chimique [n°CAS 51-18-3] (15) Plage de dose effective (mg/kg)	(rongeurs) Période d'administration	(en nombre de jours)
Triéthylènemélamine [n° CAS 51-18-3] (15)	0,25 (souris)	1
Cyclophosphamide [n° CAS 50-18-0] (19)	50-150 (souris)	5
Cyclophosphamide [n° CAS 50-18-0] (5)	25-100 (rats)	1
Méthanesulfonate d'éthyle [n° CAS 62-50-0] (13)	100-300 (souris)	5
Acrylamide monomère [n° CAS 79-06-1] (17)	50 (souris)	5
Chlorambucil [305-03-3] (14)	25 (souris)	1

Témoins négatifs

18. Les animaux témoins négatifs, traités seulement avec le solvant ou avec le véhicule, et traités par ailleurs de manière identique aux groupes témoins, sont inclus à chaque moment de prélèvement (20). En l'absence de données significatives observées ou publiées montrant que le solvant/véhicule choisi n'induit pas de mutation létale dominante ou d'autres effets délétères, des animaux témoins non traités sont également inclus à chaque moment de prélèvement afin d'établir l'acceptabilité du témoin contenant le véhicule.

MODE OPERATOIRE

Nombre d'animaux

19. Des mâles identifiés sont accouplés successivement à des intervalles appropriés prédéterminés (par exemple une fois par semaine, paragraphes 21 et 23) de préférence à une femelle vierge. Un nombre suffisamment important de mâles est prévu (et un nombre correspondant de femelles accouplées à chaque intervalle d'accouplement) afin d'obtenir l'efficacité statistique nécessaire pour détecter une fréquence de mutation létale dominante au moins multipliée par deux (paragraphe 44).

20. Le nombre de femelles par intervalle d'accouplement doit également être défini à l'avance par calculs statistiques, afin de pouvoir détecter au minimum un doublement de la fréquence de mutation létale dominante (c'est-à-dire suffisamment de femelles gravides pour obtenir au moins 400 embryons implantés au total) (20) (21) (22) (23) et escompter au moins un embryon implanté mort par unité d'analyse (soit par groupe d'accouplement et par dose) (24).

▼M8

Période d'administration et intervalles d'accouplement

21. Le nombre d'accouplements faisant suite au traitement est régi par le déroulement du traitement et doit assurer l'évaluation d'inductions de mutations létales dominantes à toutes les phases de maturation des cellules germinales mâles (12) (25). Pour un traitement unique impliquant jusqu'à cinq doses administrées quotidiennement, il faut compter 8 (pour les souris) ou 10 (pour les rats) accouplements à une semaine d'intervalle après le dernier traitement. En cas d'administrations multiples, le nombre d'accouplements peut être réduit proportionnellement à l'allongement de la période d'administration, tout en conservant pour objectif d'évaluer toutes les phases de la spermatogenèse (par exemple, après une exposition de 28 jours, seuls 4 accouplements par semaine suffisent à évaluer toutes les phases de la spermatogenèse chez la souris). Tous les calendriers de traitement et d'accouplement doivent être scientifiquement justifiés.

22. Les femelles doivent être laissées avec les mâles au moins pendant la durée d'un cycle œstral (par exemple, une semaine couvre un cycle œstral chez la souris et le rat). Les femelles qui ne se sont pas accouplées au cours d'une semaine donnée peuvent être utilisées pour un autre intervalle d'accouplement, ou jusqu'à ce que l'accouplement ait eu lieu, ce qu'indique la présence de sperme dans le vagin ou d'un bouchon vaginal.

23. Le régime d'exposition et d'accouplement retenu dépend de l'objectif final de l'étude de mutation létale dominante. Si elle a pour but de déterminer si un produit chimique donné induit des mutations létales dominantes *per se*, la méthode retenue consistera alors en l'exposition d'un cycle entier de spermatogenèse (soit 7 semaines chez la souris, à raison de 5 à 7 traitements par semaine) et en un accouplement à la fin du cycle. Cependant, si l'objectif est de recenser le type de cellule germinale sensible à une induction de mutation létale dominante, on préférera une exposition unique ou de 5 jours, suivie d'un accouplement hebdomadaire.

Niveaux de dose

24. Si l'on procède à une étude préliminaire de détermination des doses à administrer parce qu'on ne dispose pas de données fiables pour orienter le choix des doses, cette étude préliminaire doit être effectuée dans le même laboratoire, en utilisant une espèce, une souche, un sexe et un régime de traitement identiques à ceux de l'étude principale (26). Elle devra avoir pour objectif de déterminer la dose maximale tolérée (DMT), définie comme la dose la plus élevée qui sera tolérée sans faire apparaître de toxicité limitante, dans le cadre de la durée de l'étude (par exemple, comportement ou réactions anormaux, baisse mineure du poids corporel ou cytotoxicité du système hématopoïétique), mais ne provoquant pas la mort ou des signes de douleur, de souffrance ou de détresse imposant d'euthanasier les animaux (27).

25. En outre, la DMT ne doit pas affecter l'accouplement (21).

26. Les produits chimiques d'essai ayant une activité biologique spécifique à des niveaux de doses faibles et non toxiques (telles que les hormones et les mitogènes) et ceux dont les propriétés toxicocinétiques sont saturées peuvent être considérés comme des exceptions aux critères de détermination des doses et sont évalués au cas par cas.

27. Pour permettre d'obtenir des informations sur la relation dose-réponse, une étude complète doit comporter un groupe témoin négatif et au moins trois niveaux de doses, espacés en général d'un facteur de 2, mais pas de plus de 4. Si le produit chimique d'essai ne provoque aucune toxicité dans le cadre d'une étude de détermination des doses, ou d'après les données disponibles, la dose la plus élevée pour une administration unique doit être de 2 000 mg/kg de poids corporel. Néanmoins, si le produit chimique d'essai provoque une toxicité, la dose administrée la plus élevée devra correspondre

▼M8

à la DMT et les niveaux de dose employés devront de préférence s'étendre de la dose maximale à une dose induisant peu ou pas de toxicité. Pour les produits chimiques toxiques, la dose limite pour une période d'administration de 14 jours ou plus est de 1 000 mg/kg de poids corporel, et pour des périodes d'administration de moins de 14 jours, la dose limite est de 2 000 mg/kg de poids corporel/jour.

Administration des doses

28. Lors de la conception d'un essai, il convient de tenir compte de la voie d'exposition humaine anticipée. Par conséquent, les voies d'administration telles que l'alimentation, l'eau de boisson, l'inhalation, ainsi que les voies topique, sous-cutanée, intraveineuse, orale (par gavage) ou l'implantation sont autant de choix qui peuvent être considérés comme justifiés. Dans tous les cas, la voie retenue doit permettre une exposition adéquate du/des tissu(s) cible(s). L'injection intrapéritonéale n'est en général pas recommandée, car elle ne constitue pas une voie d'exposition humaine envisagée, et ne sera utilisée qu'en cas de justification scientifique spécifique. Si le produit chimique d'essai est mélangé à l'alimentation ou à l'eau de boisson, surtout dans le cas d'un dosage unique, il convient de s'assurer que le délai entre l'absorption de nourriture et d'eau et l'accouplement est suffisant pour permettre une détection des effets (paragraphe 31). Le volume maximal de liquide administrable en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne doit normalement pas excéder 1 ml/100 g de poids corporel, sauf pour les solutions aqueuses, où un maximum de 2 ml/100 g est acceptable. L'utilisation de volumes plus importants (si la législation relative au bien-être animal le permet) doit être justifiée. Il convient de minimiser la variabilité du volume testé en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant par rapport au poids corporel à tous les niveaux de doses.

Observations

29. Les animaux d'essai font l'objet d'un examen clinique général. Les signes cliniques doivent être consignés au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en prenant en considération la période où les effets anticipés devraient être les plus marqués après l'administration. Au moins deux fois par jour pendant la durée du traitement, l'ensemble des animaux fait l'objet d'un constat de morbidité et de mortalité. Chaque animal doit être pesé au début de l'étude et au moins une fois par semaine pendant les études à doses répétées, ainsi qu'au moment de l'euthanasie. La consommation alimentaire est mesurée au moins une fois par semaine. Si le produit chimique d'essai est administré dans l'eau de boisson, la consommation d'eau est mesurée à chaque changement d'eau et au moins une fois par semaine. Les animaux montrant des signes non létaux de toxicité excessive sont euthanasiés avant la fin de l'essai (27).

Collecte et traitement des tissus

30. Les femelles sont euthanasiées au cours de la seconde moitié de la gestation, au 13^{e} jour de gestation pour les souris et au 14-15^{e} jour de gestation pour les rats. Le contenu de l'utérus est examiné afin de déterminer les effets létaux dominants et de recenser le nombre d'embryons implantés, le nombre d'embryons vivants et morts ainsi que le nombre de corps jaunes.

31. Les cornes utérines et les ovaires sont exposés pour permettre de compter le nombre de corps jaunes, et les fœtus sont ôtés, comptés et pesés. Il convient d'examiner soigneusement l'utérus en vue de déceler et de comptabiliser toutes les résorptions, y compris celles dissimulées par les fœtus vivants. La mortalité fœtale est consignée. Le nombre de femelles fécondées ainsi que le nombre total d'embryons implantés, de pertes avant implantation et de mortalité après implantation (y compris les résorptions précoces et tardives)

▼M8

sont également consignés. De plus, les fœtus visibles peuvent être conservés dans une solution de Bouin pendant au moins 2 semaines, pour un examen ultérieur des principales malformations externes (28) permettant de fournir des informations supplémentaires sur les effets du produit testé sur la reproduction et le développement.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

32. Les résultats doivent être présentés sous forme d'un tableau qui indique le nombre de mâles accouplés, le nombre de femelles gravides et le nombre de femelles non gravides. Les résultats de chaque accouplement, comprenant l'identité de chaque mâle et de chaque femelle, doivent être mentionnés individuellement. Pour chaque femelle, il convient d'indiquer l'intervalle d'accouplement, le niveau de la dose reçue par les mâles traités et le nombre d'embryons implantés vivants et morts.

33. La perte après implantation est calculée en déterminant le rapport du nombre d'embryons implantés morts au nombre total d'embryons implantés dans le groupe traité et en le comparant au rapport du nombre d'embryons implantés morts au nombre total d'embryons implantés dans le groupe témoin traité avec le véhicule/solvant.

34. La perte avant implantation est calculée comme étant la différence entre le nombre de corps jaunes et le nombre d'embryons implantés ou la réduction du nombre moyen d'embryons implantés par femelle par comparaison avec les accouplements témoins. Quand la perte avant implantation a été évaluée, elle doit être mentionnée.

35. Le facteur létal dominant est estimé comme suit: (embryons morts avant implantation/total des embryons implantés par femelle) × 100.

36. Les données de toxicité et les signes cliniques tels que décrits dans le paragraphe 29 sont consignés dans le rapport.

Critères d'acceptabilité

37. Les critères suivants déterminent l'acceptabilité de l'essai:

— le témoin négatif utilisé simultanément est cohérent avec les normes publiées pour les données relatives aux témoins négatifs historiques ainsi qu'avec les données des témoins historiques du laboratoire, le cas échéant (paragraphes 10 et 18);

— les témoins positifs utilisés simultanément induisent des réponses cohérentes avec les normes publiées pour les données relatives aux témoins positifs historiques ou avec la base de données des témoins positifs historiques du laboratoire, le cas échéant, et produisent une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant (voir paragraphes 17 et 18);

— le nombre idoine d'embryons implantés et de doses est analysé (paragraphe 20);

— les critères de sélection de la dose maximale sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 24 et 27.

Évaluation et interprétation des résultats

38. Au moins trois groupes de traitement sont analysés pour obtenir des données suffisantes pour l'analyse de la relation dose-réponse.

▼**M8**

39. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si:

— au moins une des doses d'essai présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant;

— un test approprié montre que l'augmentation est liée à la dose dans au moins une condition expérimentale (par exemple un intervalle d'accouplement d'une semaine); et

— des résultats se situent à l'extérieur de la plage acceptable relative aux témoins négatifs, ou des données relatives aux témoins négatifs historiques du laboratoire (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson), le cas échéant.

Lorsque tous ces critères sont remplis, le produit chimique d'essai est considéré comme capable d'induire des mutations létales dominantes dans les cellules germinales des animaux testés. Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées figurent au paragraphe 44; d'autres approches statistiques recommandées sont également disponibles dans la littérature (20) (21) (24) (29). Les méthodes statistiques employées considèrent l'animal comme unité expérimentale.

40. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si:

— aucune dose d'essai ne présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant;

— aucune condition expérimentale n'a révélé une augmentation liée à la dose; et

— l'intégralité des résultats se situe à l'intérieur de la plage acceptable des données relatives aux témoins négatifs, ou des données relatives aux témoins négatifs historiques du laboratoire (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson), le cas échéant.

Le produit chimique d'essai est alors considéré comme capable d'induire des mutations létales dominantes dans les cellules germinales des animaux testés.

41. Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse clairement positive ou clairement négative.

42. Si la réponse n'est ni clairement négative ni clairement positive, et afin d'établir la signification biologique d'un résultat (par exemple, une augmentation faible ou marginale), les données doivent être soumises à un jugement d'experts et/ou faire l'objet de recherches supplémentaires à l'aide des données expérimentales existantes, notamment les éléments indiquant si le résultat positif se trouve à l'extérieur de la plage acceptable concernant les témoins négatifs[1], ou de la distribution des données du laboratoire concernant les témoins négatifs historiques (30).

43. Dans de rares cas, même après de nouvelles investigations, l'ensemble de données ne permettra pas de conclure que les résultats sont positifs ou négatifs; les résultats seront alors déclarés équivoques.

44. Les méthodes statistiques employées considèrent l'animal mâle comme unité expérimentale. S'il est possible que le décompte (par exemple le nombre d'embryons implantés par femelle) suive la loi de Poisson et/ou que certaines proportions (par exemple une proportion d'embryons implantés morts) présentent une distribution binomiale, on observe souvent une surdispersion de ces données (31). Par conséquent, les analyses statistiques doivent d'abord recourir à un test de surdispersion ou de sousdispersion basé sur des tests de la variance tels que le test de variance binomiale de Cochran (32) ou le test de la C (α) de Tarone pour la surdispersion binomiale (31) (33). Si aucun écart par rapport à la dispersion binomiale n'est observé, un test de tendance de Cochran-Armitage peut être effectué pour les tendances de proportions dans les différents niveaux de doses (34) et des comparaisons

▼M8

par paires avec le groupe témoin peuvent être faites à l'aide d'un test exact de Fisher (35). De même, si aucun écart par rapport à la dispersion de Poisson n'est détecté, les tendances des décomptes peuvent être testées à l'aide de la régression de Poisson (36) et des comparaisons par paires avec le groupe témoin peuvent être réalisées dans le contexte du modèle de Poisson, à l'aide de contrastes par paires (36). Si une surdispersion ou une sousdispersion significative est détectée, il est recommandé de recourir à des méthodes non paramétriques (23, 31), notamment les tests par les rangs tels que le test de tendance de Jonckheere-Terpstra (37) et les tests de Mann-Whitney (38) pour les comparaisons par paires avec le groupe témoin traité avec le véhicule/solvant, mais aussi les tests de permutation, de rééchantillonnage ou de bootstrap pour les comparaisons de tendances et les comparaisons par paires avec le groupe témoin (31) (39).

45. Un essai positif de mutation létale dominante met en lumière la génotoxicité du produit chimique d'essai sur les cellules germinales du mâle traité de l'espèce testée.

46. Le fait d'examiner si les valeurs observées se situent à l'intérieur de la plage des témoins historiques peut fournir des indications au moment de l'évaluation de la signification biologique de la réponse (40).

Rapport d'essai

47. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Résumé.

Produit chimique d'essai:

— source, numéro de lot, date limite d'utilisation si disponibles;

— stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue;

— solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant, si elles sont connues;

— mesure du pH, de l'osmolalité et de la précipitation dans le milieu de culture auquel le produit chimique d'essai a été ajouté, le cas échéant.

Substance mono-constituant:

— apparence physique, hydrosolubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude;

— identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés, s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges:

— caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants.

Préparation du produit chimique d'essai:

— justification du choix du véhicule;

— solubilité et stabilité du produit chimique dans le solvant/véhicule, si elles sont connues;

▼**M8**

— préparation des formulations à administrer dans l'alimentation, l'eau de boisson ou par inhalation;

— déterminations analytiques sur les formulations (stabilité, homogénéité, concentrations nominales, par exemple), lorsqu'elles ont été réalisées.

Animaux d'essai:

— espèces/souches utilisées et justification du choix;

— nombre, âge et sexe des animaux;

— source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.;

— méthode d'identification individuelle des animaux;

— pour les études de courte durée: poids corporel de chaque mâle au début et à la fin de l'essai; pour les études d'une durée supérieure à une semaine: poids individuel des animaux et consommation de nourriture. La plage des poids corporels, ainsi que la moyenne et l'écart type pour chaque groupe doivent également être mentionnés.

Conditions de l'essai:

— données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule);

— données de l'étude préliminaire de détermination des concentrations;

— justification du choix des doses;

— détails sur la préparation du produit chimique d'essai;

— détails sur l'administration du produit chimique d'essai;

— justification du choix de la voie d'administration;

— méthodes de mesure de la toxicité animale, y compris, si elles existent, analyses histopathologiques ou hématologiques et fréquence des observations animales et des mesures du poids corporel;

— méthodes permettant de vérifier que le produit chimique d'essai a atteint le tissu cible ou la circulation sanguine en cas de résultats négatifs;

— dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour) calculée en fonction de la concentration (ppm) du produit chimique d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson, et de la consommation, s'il y a lieu;

— détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau;

— détails de l'enrichissement environnemental des cages;

— description détaillée des programmes de traitement et d'échantillonnage, et justification des choix;

— méthode d'analgésie;

— méthode d'euthanasie;

▼**M8**

— procédures d'isolement et de conservation des tissus;

— source et numéros de lot de l'ensemble du matériel et de tous les réactifs (s'il y a lieu);

— méthodes d'énumération des mutations létales dominantes;

— programme d'accouplement;

— méthodes utilisées pour déterminer si l'accouplement a eu lieu;

— moment de l'euthanasie;

— critères permettant d'examiner les effets létaux dominants, y compris les corps jaunes, les embryons implantés, les résorptions et les pertes avant implantation, les embryons implantés vivants, les embryons implantés morts.

Résultats:

— état de santé des animaux avant et pendant la période d'essai, y compris signes de toxicité;

— poids corporel des mâles pendant le traitement et les périodes d'accouplement;

— nombre de femelles accouplées;

— relation dose-réponse, si possible;

— données relatives aux animaux témoins négatifs concomitants et données des témoins négatifs historiques avec plages, moyennes et écarts-types;

— données des témoins positifs concomitants;

— tableau de données pour chaque femelle gravide comprenant: le nombre de corps jaunes; le nombre d'embryons implantés; le nombre de résorptions et de pertes avant implantation; le nombre d'embryons implantés vivants; le nombre d'embryons implantés morts; le poids des fœtus;

— résumé des données ci-dessus pour chaque période d'accouplement et pour chaque dose, avec la fréquence des effets létaux dominants;

— analyses et méthodes statistiques employées.

Discussion des résultats.

Conclusion.

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, N°234, OCDE, Paris.

(2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.* (Eds.) pp. 235-334, Elsevier, Amsterdam

(3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., and Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group «Dominant» lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol., 39*, 173-185

▼**M8**

(4) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. Mutation Res,. 352:159-167.

(5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. and Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. Mutation Res., 48:267-270.

(6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. and Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. Mutation Res., 397:77-74.

(7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. and Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol.* Lett. 20:325-329.

(8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. and Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. Fundam. Appl. *Toxicol*., 3:80-85.

(9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., and Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, Mutation Res., 33, 239-249.

(10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. and Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616-624.

(11) Marchetti F. and Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. Birth Defects Res., C 75:112-129.

(12) Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. Mutation Res., 352:169-172.

(13) Favor J., and Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, Mutation Res., 53: 21–27.

(14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. and Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. Mutation Res., 345:167-180.

(15) Hastings S.E., Huffman K.W. and Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, Mutation Res., 40:371-378.

(16) James D.A. and Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, Mutation Res., 99:303-314.

(17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. and Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. Mutation Res., 173:35-40.

▼**M8**

(18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. and Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, Mutation Res., 296: 143-156.

(19) Holstrom L.M., Palmer A.K. and Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland D.J. and Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 129-156.

(20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417:19–30.

(21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312:313-318.

(22) Generoso W.M. and Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. Methods, *Toxicol*., 3A:124-141.

(23) Haseman J.K. and Soares E.R. (1976).The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. Mutation. Res., 41: 277-288.

(24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, Teratogen. Carcinogen. *Mutagen*., 1:353 – 360.

(25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., and Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. Mutation. Res., 85:417-429.

(26) Fielder R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagen., 7:313-319.

(27) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 19.), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(28) Barrow M.V., Taylor W.J and Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.

(29) Kirkland D.J., (Ed.)(1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.

(30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. and Thybaud V. (2011). «Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data», Mutation. Res., 723:87-90.

(31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. and Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. Mutation. Res., 272:35-58.

(32) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. Biometrics, 10: 417-451.

▼**M8**

(33) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590.

(34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. In *Encyclopedia of* Statistical Sciences, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Eds.), pp. 334-336. John Wiley and Sons, New York.

(35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).

(36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, Chapters 14 and 17. McGraw-Hill, Boston

(37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika,* 41:133-145.

(38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York

(39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.

(40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

▼**M8**

Appendice 1

DÉFINITIONS

Produit chimique: une substance ou un mélange

Corps jaune: formation à l'intérieur de l'ovaire qui résulte de la transformation d'un follicule ayant expulsé l'ovocyte et qui a un rôle hormonal. Le nombre de corps jaunes dans les ovaires correspond au nombre d'ovocytes produits.

Mutation létale dominante: mutation qui se produit dans une cellule germinale ou qui se fixe après la fécondation, et qui est mortelle pour l'embryon ou le fœtus.

Taux de fertilité: nombre de femelles gravides divisé par le nombre total de femelles accouplées.

Intervalle d'accouplement: laps de temps entre la fin de l'exposition et l'accouplement des mâles traités. Le contrôle de cet intervalle permet d'évaluer les effets des produits chimiques sur différents types de cellules germinales. L'accouplement des souris au cours des semaines 1, 2, 3, 4, 5, 6, et 7 qui suivent la fin de l'exposition mesure les effets sur le sperme testiculaire, les spermatides condensées, les spermatides rondes, les spermatocytes au stade pachytène, les spermatocytes précoces, les spermatogonies différenciées, les spermatogonies en cours de différenciation et les spermatogonies des cellules souches.

Pertes avant implantation: différence entre le nombre d'embryons implantés et le nombre de corps jaunes. Elles peuvent aussi être estimées en comparant le nombre total d'embryons implantés par femelle dans les groupes traités et dans les groupes témoins.

Pertes après implantation: rapport du nombre d'embryons morts au nombre total d'embryons implantés dans le groupe traité comparé au rapport du nombre d'embryons morts au nombre total d'embryons implantés dans le groupe témoin.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

UVCB: substances chimiques de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes et matières biologiques

▼**M8**

Appendice 2

CYCLE DE LA SPERMATOGENÈSE CHEZ LES MAMMIFÈRES

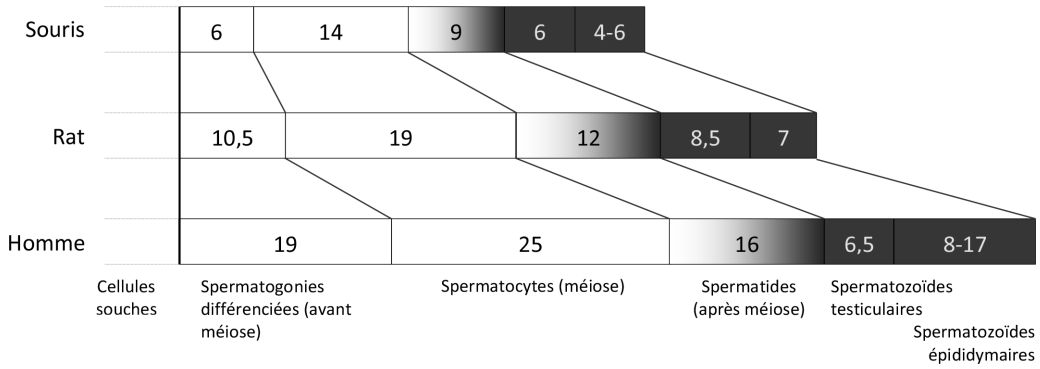


Fig.1: Comparaison de la durée (en jours) du développement des cellules germinales mâles chez la souris, le rat et l'homme. La réparation de l'ADN ne se produit pas pendant les périodes indiquées en grisé.

Cycle de la spermatogenèse chez la souris, le rat et l'homme (Adler, 1996). Les spermatogonies indifférenciées incluent les spermatogonies A-single, A-paired, et A-aligned (Hess et de Franca, 2008). Les A-single sont considérées comme les véritables cellules souches. C'est pourquoi, pour évaluer les effets sur les cellules souches, au moins 49 jours (chez la souris) doivent s'écouler entre la dernière injection du produit chimique d'essai et l'accouplement.

Références

Adler, ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. Mutat Res, 352:169-172.

Hess, RA, De Franca LR (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences and Springer Science & Business Media:1-15.

▼**M8**

B.23. **ESSAI D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE SUR SPERMATOGONIES DE MAMMIFÈRES**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 483 (2016) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les méthodes d'essai sont régulièrement mises à jour à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences réglementaires et de considérations relatives au bien-être des animaux. La présente version modifiée de la méthode d'essai reflète les connaissances scientifiques acquises après de nombreuses années d'expérience de cet essai et tient compte des possibilités de l'intégrer ou de le combiner à d'autres études de toxicité ou de génotoxicité. Combiner différentes études de toxicité permet potentiellement de réduire le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ces essais. La présente méthode d'essai s'inscrit dans une série de lignes directrices sur la toxicologie génétique. L'OCDE a élaboré un document qui fournit des éléments d'information concis sur les essais de toxicologie génétique et donne un aperçu des récents changements qui ont été apportés aux lignes directrices de toxicologie génétique de l'OCDE (1).

2. L'essai d'aberration chromosomique pratiqué *in vivo* sur des spermatogonies de mammifères est destiné à détecter les produits chimiques qui causent des aberrations chromosomiques structurales dans les cellules de spermatogonies de mammifère (2) (3) (4). Par ailleurs, cet essai se prête bien à l'évaluation de la génotoxicité, car, malgré des variations entre les espèces, les facteurs du métabolisme *in vivo*, la pharmacocinétique et les processus de réparation de l'ADN sont actifs et contribuent aux réponses. Cette méthode d'essai n'est pas conçue pour mesurer les aberrations numériques, et n'est pas utilisée de façon régulière dans ce but.

3. Cet essai mesure les aberrations chromosomiques structurales (de type chromosomique et chromatidique) qui surviennent dans les spermatogonies et devrait par conséquent permettre de prévoir l'induction de mutations héritées dans les cellules germinales.

4. Les définitions des termes clés figurent dans l'appendice.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

5. Les rongeurs sont couramment utilisés dans cet essai, mais dans certains cas, d'autres espèces peuvent convenir si cela est justifié sur le plan scientifique. Les préparations cytogénétiques standard des essais réalisés sur rongeurs permettent l'obtention de métaphases mitotiques (spermatogonies) et méiotiques (spermatocytes). Ces métaphases sont identifiées en fonction de la morphologie des chromosomes (4). Cet essai cytogénétique *in vivo* détecte les aberrations chromosomiques structurales dans les mitoses des spermatogonies. Les autres cellules cibles ne sont pas concernées par la présente méthode d'essai.

6. Afin de détecter les aberrations chromatidiques dans les cellules de spermatogonies, il faut examiner la première division cellulaire mitotique après le traitement, avant que ces aberrations n'évoluent en aberrations chromosomiques dans les divisions cellulaires ultérieures. Des informations complémentaires peuvent être obtenues après traitement des spermatocytes, à partir de l'analyse des chromosomes méiotiques mettant en évidence les aberrations chromosomiques structurales aux stades de la diacinèse et des métaphases I et II.

▼**M8**

7. Les testicules contiennent plusieurs générations de spermatogonies (5). Ces différentes cellules germinales peuvent présenter des sensibilités diverses au traitement chimique. De ce fait, les aberrations détectées sont une réponse globale des populations de cellules de spermatogonies traitées. La majorité des cellules mitotiques présentes dans les préparations de testicules sont des spermatogonies de type B, dont le cycle cellulaire dure environ 26 heures (3).

8. Cet essai n'est pas pertinent s'il est prouvé que le produit chimique d'essai, ou son (ses) métabolite(s), n'atteindront pas le testicule.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

9. En règle générale, les animaux sont exposés au produit chimique d'essai par une voie d'exposition idoine et sont euthanasiés à des délais appropriés après le traitement. Avant l'euthanasie, les animaux sont traités avec un inhibiteur du fuseau (par exemple la colchicine ou le Colcemid®). Ensuite, les préparations chromosomiques effectuées à partir des cellules germinales sont colorées et les cellules en métaphase sont analysées pour mettre en évidence les aberrations chromosomiques.

VÉRIFICATION DES COMPÉTENCES DU LABORATOIRE

10. La compétence à mener cet essai est établie sur la base d'informations démontrant l'aptitude à reproduire les résultats escomptés concernant la fréquence des aberrations chromosomiques structurales dans les spermatogonies avec des substances chimiques utilisées comme témoins positifs (réponses faibles comprises) telles que celles énumérées dans le tableau 1 et à obtenir une fréquence avec témoins négatifs qui soit cohérente avec la plage acceptable des données publiées dans la littérature [par exemple (2)(3)(6)(7)(8)(9)(10)] ou avec la distribution des données des témoins historiques du laboratoire, le cas échéant.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Préparations

Choix des espèces animales

11. Il convient d'employer de jeunes animaux adultes sains issus de souches courantes de laboratoire. On utilise communément des souris mâles, mais des mâles d'autres espèces de mammifères appropriées peuvent cependant être employés si cela est justifié sur le plan scientifique, et si cela permet de combiner cette étude à une méthode d'essai. L'utilisation d'une espèce autre que les rongeurs doit être scientifiquement justifiée dans le rapport.

Conditions d'encagement et d'alimentation des animaux

12. Pour les rongeurs, la température de l'animalerie doit être maintenue à 22 °C (±3 °C). L'humidité relative, qui est idéalement de 50 à 60 %, doit atteindre au moins 40 % et de préférence ne pas dépasser 70 %, sauf durant le nettoyage du local. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire des animaux est le régime classique de laboratoire avec eau potable à volonté. Le choix des aliments peut être influencé par la nécessité d'assurer une bonne incorporation du produit chimique dans la nourriture si l'administration se fait par cette voie. Les rongeurs sont mis en cage par petits groupes d'individus (cinq au maximum par cage), si aucun comportement agressif n'est à craindre, de préférence dans des cages à fond plein dotées d'un enrichissement environnemental approprié. Les animaux peuvent être encagés individuellement si cela est justifié sur le plan scientifique.

▼M8

Préparation des animaux

13. De jeunes adultes mâles en bonne santé (âgés de 8-12 semaines au début du traitement) sont normalement utilisés et sont répartis au hasard dans les groupes témoins et les groupes de traitement. Chaque animal est identifié individuellement selon une méthode sans cruauté, la moins invasive possible (par exemple, baguage, étiquetage, pose d'une puce électronique ou identification biométrique, en évitant l'entaillage des oreilles ou la phalangectomie) et gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire. Les cages doivent être placées de manière à réduire au minimum l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats. Il convient d'éviter toute contamination croisée entre le témoin positif et le produit chimique d'essai. Au début de l'étude, la variation pondérale entre chaque animal doit être minimale et ne pas dépasser ±20 %.

Préparation des doses

14. Les produits chimiques solides sont dissouts, mis en suspension dans des solvants ou véhicules appropriés ou incorporés dans les aliments ou dans l'eau de boisson avant d'être administrés aux animaux. Les produits chimiques liquides peuvent être administrés directement ou dilués avant d'être administrés. En cas d'exposition par inhalation, les produits chimiques d'essai peuvent être administrés sous forme de gaz, de vapeur ou d'aérosol solide ou liquide, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. On utilisera des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage et définissent les conditions de stockage appropriées.

Conditions expérimentales - Solvant/véhicule

15. Le solvant/véhicule ne doit pas produire d'effets toxiques aux doses utilisées, ni pouvoir réagir avec les produits chimiques d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données de référence faisant état de leur compatibilité. Il est recommandé d'envisager en premier lieu l'utilisation d'un solvant/véhicule aqueux chaque fois que c'est possible. Parmi les exemples de solvants/véhicules compatibles couramment utilisés figurent notamment l'eau, le sérum physiologique, les solutions de méthylcellulose, les solutions de carboxyméthylcellulose sodique, l'huile d'olive et l'huile de maïs. En l'absence de données observées ou publiées montrant que le véhicule/solvant inhabituel sélectionné n'induit aucune aberration chromosomique structurale ou effet délétère, une étude initiale devra être réalisée afin d'établir l'acceptabilité du témoin de solvant/véhicule.

Témoins positifs

16. Des animaux témoins positifs sont toujours inclus simultanément dans l'essai, à moins que le laboratoire n'ait déjà démontré ses compétences dans la conduite de l'essai et n'ait mené le test en routine récemment (par exemple dans les cinq dernières années). Quand un témoin positif n'est pas testé en parallèle, des témoins d'analyse (lames fixées non colorées) doivent être compris dans chaque expérience. Ceux-ci peuvent être obtenus en incluant dans chaque étude des échantillons de référence en provenance de témoins positifs d'autres études conduites de façon périodique (par exemple tous les 6-18 mois) dans le laboratoire où le test est effectué, par exemple lors d'épreuves de compétence, et de façon plus régulière par la suitery.

17. Les substances utilisées comme témoins positifs doivent produire, de façon fiable, un accroissement détectable de la fréquence des cellules présentant des aberrations chromosomiques par rapport au niveau spontané. Les doses des témoins positifs doivent être choisies de telle sorte que les effets soient nets mais que l'identité des lames codées ne soit pas évidente pour l'examinateur. Des exemples de substances chimiques utilisées comme témoins positifs figurent au tableau 1 ci-dessous.

▼M8

Tableau 1

Exemples de substances chimiques utilisées comme témoins positifs

Substances chimiques et n° CAS (n° de référence)
Cyclophosphamide [n° CAS 50-18-0] cyclophosphamide monohydratée [n° CAS 6055-19-2] (9)
Cyclohexylamine [n° CAS 108-91-8] (7)
Mitomycine C [n° CAS 50-07-7] (6)
Acrylamide monomère [n° CAS 79-06-1] (10)
Triéthylènemélamine [n° CAS 51-18-3] (8)

Témoins négatifs

18. Les animaux servant de témoins négatifs, traités seulement avec le solvant ou avec le véhicule, et traités par ailleurs de manière identique aux groupes de traitement, sont inclus à chaque moment de prélèvement. En l'absence de données observées ou publiées montrant que le solvant/véhicule choisi n'induit pas d'aberrations chromosomiques ou d'autres effets délétères, des animaux témoins non traités sont également inclus à chaque moment de prélèvement afin d'établir l'acceptabilité du témoin contenant le véhicule.

PROCÉDURE

Nombre d'animaux

19. La taille des groupes au début de l'étude doit permettre de disposer d'au moins cinq animaux mâles dans chaque groupe. Ce nombre d'animaux par groupe est considéré comme suffisant pour fournir une efficacité statistique idoine (c'est-à-dire généralement capable de détecter au moins un doublement de la fréquence des aberrations chromosomiques lorsque le niveau du témoin négatif est de 1,0 % ou plus assorti d'une probabilité de 80 % à un niveau de signification de 0,05) (3) (11). À titre d'information, concernant les exigences relatives au nombre maximum d'animaux généralement utilisés, une étude comptant deux moments de prélèvement et impliquant trois groupes de traitement, un groupe de témoins négatifs concomitants et un groupe de témoins positifs (chaque groupe étant composé de cinq animaux) nécessitera 45 animaux.

Déroulement du traitement

20. Les produits chimiques d'essai sont habituellement administrés une seule fois (c'est-à-dire en un seul traitement). D'autres régimes de dosage sont acceptables pour autant qu'ils soient scientifiquement justifiés.

21. Dans le groupe qui reçoit la dose la plus forte, les prélèvements sont effectués à deux intervalles après le traitement. Étant donné que le temps requis par l'absorption et la métabolisation du ou des produits chimiques d'essai, ainsi que leur effet sur la cinétique du cycle cellulaire peuvent influer sur le moment optimal pour la détection des aberrations chromosomiques, deux prélèvements sont donc effectués, le premier, précoce aux environs de 24 heures et le deuxième, tardif, autour de 48 heures après le traitement. S'agissant des niveaux de dose inférieurs à la dose la plus élevée, il convient de choisir un intervalle de prélèvement précoce de 24 heures (soit une durée inférieure ou égale à la durée du cycle cellulaire d'une spermatogonie B, ce qui optimise ainsi la probabilité de pouvoir analyser les premières métaphases post-traitement), à moins que l'on sache qu'il existe un autre délai de prélèvement justifié et plus propice à la détection des effets.

22. D'autres moments de prélèvement peuvent être retenus. Par exemple, dans le cas des produits chimiques susceptibles de provoquer des effets indépendants de la phase S, il peut être judicieux d'effectuer des prélèvements plus précoces (soit à un intervalle de moins de 24 heures).

▼M8

23. Un régime de traitement à doses répétées peut être employé notamment dans les cas où cet essai est associé à un test sur un autre effet mesuré dont la période d'administration est de 28 jours (par exemple, la méthode d'essai B.58). Le cas échéant, cependant, des groupes d'animaux supplémentaires seront requis afin de tenir compte des différents délais de prélèvement. Par conséquent, le caractère approprié d'un tel programme doit être justifié sur le plan scientifique au cas par cas.

24. Avant l'euthanasie, les animaux reçoivent une dose appropriée d'un inhibiteur du fuseau (par exemple le Colcemid® ou la colchicine) par injection intrapéritonéale. Les échantillons sont prélevés après des délais appropriés. Pour les souris et les rats, ce délai est compris approximativement entre 3 et 5 heures.

Niveaux de dose

25. Si l'on procède à une étude préliminaire de détermination des doses à administrer parce qu'on ne dispose pas de données fiables pour orienter le choix des doses, cette étude préliminaire doit être effectuée dans le même laboratoire, en utilisant une espèce, une souche, un sexe et un régime de traitement identiques à ceux de l'étude principale, conformément aux recommandations relatives aux études de détermination des doses (12). L'étude devra avoir pour objectif de déterminer la dose maximale tolérée (DMT), définie comme la dose entraînant de légers effets toxiques dans le cadre de la durée de l'étude (par exemple, en induisant un comportement ou des réactions anormales, une baisse mineure du poids corporel ou une cytotoxicité du système hématopoïétique) mais ne provoquant pas la mort ou des signes de douleur, de souffrance ou de détresse imposant une euthanasie de l'animal (13).

26. La dose la plus élevée peut aussi être définie comme étant celle qui produit certains indices de toxicité dans les cellules de spermatogonies (par exemple une diminution du rapport entre le nombre de mitoses des spermatogonies et le nombre des métaphases I et II de la méiose. Cette diminution ne doit cependant pas dépasser 50 %.

27. Les produits chimiques d'essai ayant une activité biologique spécifique à des niveaux de doses faibles et non toxiques (telles que les hormones et les mitogènes) et les produits chimiques qui présentent une saturation des propriétés toxicocinétiques peuvent être considérés comme des exceptions aux critères de détermination des doses et sont évalués au cas par cas.

28. Pour permettre d'obtenir des informations sur la relation dose-réponse, une étude complète doit comporter un groupe témoin négatif (paragraphe 18) et au moins trois niveaux de doses, espacés en général d'un facteur de 2, mais pas de plus de 4. Si le produit chimique d'essai ne provoque aucune toxicité dans le cadre d'une étude de détermination des doses, ou d'après les données disponibles, la dose la plus élevée pour une administration unique doit être de 2 000 mg/kg de poids corporel. Néanmoins, si le produit chimique d'essai provoque une toxicité, la dose administrée la plus élevée devra correspondre à la DMT et les niveaux de dose employés devront de préférence s'étendre de la dose maximale à une dose induisant peu ou pas de toxicité. Lorsqu'une toxicité sur le tissu cible (testicule) est observée à tous les niveaux de doses administrés, il est conseillé de procéder à des études complémentaires à des doses non toxiques. Les études visant à caractériser davantage les informations sur la relation quantitative dose-réponse peuvent nécessiter un ou plusieurs groupes de traitement supplémentaires. Enfin, ces limites peuvent varier pour certains types de produits chimiques d'essai (par exemple les produits pharmaceutiques à usage humain) faisant l'objet d'exigences spécifiques. Si le produit chimique d'essai provoque une toxicité, il conviendra de choisir la dose limite ainsi que deux niveaux de doses inférieurs à cette dernière (tel que décrit ci-dessus). Pour une période d'administration égale ou supérieure à 14 jours, la dose limite est de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, et pour des périodes d'administration de moins de 14 jours, la dose limite est de 2 000 mg/kg de poids corporel/jour.

▼M8

Administration des doses

29. Lors de la conception d'un essai, il convient de tenir compte de la voie d'exposition humaine anticipée. Par conséquent, les voies d'administration telles que l'alimentation, l'eau de boisson, l'inhalation, l'implantation ainsi que les voies topique, sous-cutanée, intraveineuse et orale (par gavage) sont autant de choix qui peuvent être considérés comme justifiés. Dans tous les cas, la voie retenue doit permettre une exposition adéquate du tissu cible. L'injection intrapéritonéale n'est normalement pas recommandée sauf si elle est scientifiquement justifiée car la cavité péritonéale n'est généralement pas une voie d'exposition humaine physiologiquement pertinente. Si le produit chimique d'essai est mélangé à l'alimentation ou à l'eau de boisson, surtout dans le cas d'un dosage unique, il convient de s'assurer que le délai entre l'absorption de nourriture et d'eau et le prélèvement est suffisant pour permettre une détection des effets (voir paragraphe 33). Le volume maximal de liquide administrable en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Le volume ne doit normalement pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas des solutions aqueuses où un maximum de 2 ml/100 g est acceptable. L'administration de volumes plus importants (si la législation relative au bien-être animal le permet) doit être justifiée. Il convient de minimiser la variabilité du volume testé en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant par rapport au poids corporel à tous les niveaux de doses.

Observations

30. Les animaux d'essai font l'objet d'un examen clinique général. Les signes cliniques doivent être consignés au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en prenant en considération la période où les effets anticipés devraient être les plus marqués après l'administration. Au moins deux fois par jour, l'ensemble des animaux fait l'objet d'un constat de morbidité et de mortalité. Tous les animaux doivent être pesés au début de l'étude, au moins une fois par semaine au cours des études à doses répétées, puis lors de l'euthanasie. Pour les études dont la durée est égale ou supérieure à une semaine, la consommation de nourriture doit également être mesurée au moins une fois par semaine. Si le produit chimique d'essai est administré dans l'eau de boisson, la consommation d'eau est mesurée à chaque changement d'eau et au moins une fois par semaine. Les animaux montrant des signes non létaux de toxicité excessive sont euthanasiés avant la fin de l'essai (13).

Préparation des chromosomes

31. Des cellules germinales en suspension obtenues à partir de l'une ou des deux testicules immédiatement après l'euthanasie sont exposées à une solution hypotonique et fixées selon les protocoles établis (2) (14) (15) par exemple). Les cellules sont alors étalées sur des lames et colorées (16) (17). Toutes les lames doivent être codées afin que leur identité ne soit pas révélée à l'examinateur.

Analyse

32. Il y a lieu d'examiner au moins 200 cellules en métaphase bien étalées pour chaque animal (3) (11). Si la fréquence des témoins négatifs historiques est < 1 %, il convient alors d'examiner plus de 200 cellules/animal afin d'augmenter l'efficacité statistique (3). Le recours à des méthodes de coloration permettant l'identification du centromère est conseillé.

33. Il convient de consigner séparément les aberrations chromatidiques et chromosomiques et de les classer par sous-catégories (cassures, échanges). Les lacunes sont enregistrées mais non prises en compte pour déterminer si un produit chimique induit une hausse notable de l'incidence des cellules porteuses d'aberrations chromosomiques. Les procédures en cours dans le laboratoire doivent assurer que l'analyse des aberrations chromosomiques est

▼M8

réalisée par des examinateurs qualifiés. Étant donné que les procédures de préparation des lames provoquent souvent la rupture d'une certaine fraction des cellules en métaphase, entraînant une perte de chromosomes, toutes les cellules examinées doivent contenir un nombre de centromères égal ou supérieur à $2n \pm 2$, n étant le nombre haploïde de chromosomes pour cette espèce.

34. Bien que l'essai soit destiné à détecter les aberrations chromosomiques structurales, il est important de rapporter la fréquence des cellules polyploïdes et de celles présentant des chromosomes endoreduplicués le cas échéant (voir paragraphe 44).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

35. Les résultats individuels pour chaque animal sont présentés sous forme de tableaux. Le nombre de cellules présentant une (des) aberration(s) chromosomique(s) structurale(s) et le nombre d'aberrations chromosomique(s) par cellule doivent être évalués pour chaque animal. Les aberrations chromatidiques et chromosomiques classées par sous-catégorie (cassure, échange) doivent être consignées séparément, avec leur nombre et leur fréquence pour les groupes traités et les groupes témoins. Les lacunes sont enregistrées séparément. La fréquence des lacunes est rapportée mais n'est généralement pas incluse dans l'analyse de la fréquence totale des aberrations chromosomiques structurales. Le pourcentage de cellules polyploïdes et de cellules présentant des chromosomes endoreduplicués est rapporté le cas échéant.

36. Les données de toxicité et les signes cliniques tels que décrits dans le paragraphe 30 sont consignés dans le rapport.

Critères d'acceptabilité

37. Les critères suivants déterminent l'acceptabilité de l'essai:

— Les témoins négatifs utilisés simultanément induisent des réponses cohérentes avec les normes publiées pour les données relatives aux témoins négatifs historiques, qui se situent généralement entre > 0 % et $\leq 1{,}5$ % cellules comportant des aberrations chromosomiques, ainsi qu'avec les données des témoins historiques du laboratoire, le cas échéant (voir paragraphes 10 et 18).

— Les témoins positifs utilisés simultanément induisent des réponses cohérentes avec les normes publiées pour les données relatives aux témoins positifs historiques ou avec la base de données des témoins positifs historiques du laboratoire, le cas échéant et produisent une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant (voir paragraphes 17, 18).

— Le nombre idoine de cellules et de doses est analysé (voir paragraphes 28 et 32).

— Les critères de sélection de la dose maximale sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 25 et 26.

38. Lorsqu'on observe des mitoses ainsi que des méioses, il faut déterminer le rapport entre le nombre de mitoses des spermatogonies et le nombre de premières et secondes métaphases méiotiques pour tous les animaux traités et témoins négatifs, dans un échantillon total de 100 cellules en division par animal. Dans le cas où il s'agit uniquement de mitose, l'indice mitotique doit être déterminé dans au moins 1 000 cellules de chaque animal.

Évaluation et interprétation des résultats

39. Au moins trois groupes de traitement sont analysés pour obtenir des données suffisantes pour l'analyse de la relation dose-réponse.

▼**M8**

40. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si:

— au moins une des doses d'essai présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant;

— l'augmentation est liée à la dose pour au moins l'un des moments de prélèvement; et

— des résultats se situent à l'extérieur de la plage acceptable de données relatives aux témoins négatifs, ou des données relatives aux témoins négatifs historiques du laboratoire le cas échéant (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson.

Lorsque tous ces critères sont remplis, le produit chimique d'essai est considéré comme capable d'induire des aberrations chromosomiques dans les cellules de spermatogonies des animaux testés. Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont également disponibles dans la littérature (11) (18). Les méthodes statistiques employées considèrent l'animal comme unité expérimentale.

41. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si:

— aucune dose d'essai ne présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant;

— aucune condition expérimentale n'a révélé une augmentation liée à la dose; et,

— l'intégralité des résultats se situe à l'intérieur de la plage acceptable de données relatives aux témoins négatifs ou des données du laboratoire relatives aux témoins négatifs historiques, le cas échéant (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson.

Le produit chimique d'essai est alors considéré comme incapable d'induire des aberrations chromosomiques dans les cellules de spermatogonies de l'animal testé. Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont également disponibles dans la littérature (11) (18). Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité que le produit chimique puisse induire des aberrations chromosomiques à des stades de développement ultérieurs non étudiés, ou des mutations génétiques.

42. Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse clairement positive ou clairement négative.

43. Si la réponse n'est ni clairement négative ni clairement positive, et afin d'établir la signification biologique d'un résultat (par exemple, une augmentation faible ou marginale), les données doivent être soumises à un jugement d'experts et/ou faire l'objet de recherches supplémentaires à l'aide des données expérimentales existantes, en vérifiant par exemple si le résultat positif se situe en dehors de la plage acceptable des données relatives aux témoins négatifs ou des données des témoins négatifs historiques du laboratoire (19).

44. Dans de rares cas, même après de nouvelles investigations, l'ensemble de données ne permettra pas de conclure que les résultats sont positifs ou négatifs; les résultats seront alors déclarés équivoques.

45. Une augmentation du nombre de cellules polyploïdes peut signifier que le produit chimique d'essai est capable d'inhiber les processus mitotiques et d'induire des aberrations chromosomiques numériques (20). Une augmentation du nombre de cellules présentant des chromosomes endorédupliqués peut indiquer que le produit chimique d'essai est capable d'inhiber la progression du cycle cellulaire (21) (22), un mécanisme qui, bien que différent de l'inhibition des processus mitotiques, induit lui aussi des modifications du nombre de chromosomes (voir paragraphe 2). La fréquence des cellules polyploïdes et des cellules présentant des chromosomes endorédupliqués doit donc être consignée séparément.

▼**M8**

Rapport d'essai

46. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Résumé.

Produit chimique d'essai:

— source, numéro de lot, date limite d'utilisation, si elle est disponible;

— stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue;

— solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant, si elles sont connues;

— mesure du pH, de l'osmolalité et de la précipitation dans le milieu de culture auquel le produit chimique d'essai a été ajouté, le cas échéant.

Substance mono-constituant:

— apparence physique, hydrosolubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude;

— identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés, s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges:

— caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants.

Préparation du produit chimique d'essai:

— justification du choix du véhicule;

— solubilité et stabilité du produit chimique dans le solvant/véhicule.

— préparation des formulations à administrer dans l'alimentation, l'eau de boisson ou par inhalation;

— déterminations analytiques sur les formulations (stabilité, homogénéité, concentrations nominales, par exemple) le cas échéant;

Animaux d'essai:

— espèces/souches utilisées et justification;

— nombre et âge des animaux;

— source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.;

— méthode d'identification individuelle des animaux;

— pour les études de courte durée: poids individuel des animaux au début et à la fin de l'essai; pour les études d'une durée supérieure à une semaine: poids individuel des animaux et consommation de nourriture. La plage des poids corporels, ainsi que la moyenne et l'écart type pour chaque groupe doivent également être mentionnés.

Conditions de l'essai:

— données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule);

▼**M8**

— données issues de l'étude de détermination des doses, si elle a été réalisée;

— justification du choix des doses;

— justification du choix de la voie d'administration;

— détails sur la préparation du produit chimique d'essai;

— détails sur l'administration du produit chimique d'essai;

— justification du choix des délais de sacrifices;

— méthodes de mesure de la toxicité animale, y compris, si elles existent, analyses histopathologiques ou hématologiques et fréquence des observations animales et des mesures du poids corporel;

— méthodes permettant de vérifier que le produit chimique d'essai a atteint le tissu cible ou la circulation sanguine en cas de résultats négatifs;

— dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour) calculée en fonction de la concentration (ppm) du produit chimique d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson, et de la consommation, s'il y a lieu;

— détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau;

— description détaillée des programmes de traitement et de prélèvement et justification des choix;

— méthode d'euthanasie;

— méthode d'analgésie (le cas échéant);

— procédures d'isolement des tissus;

— nature et concentration de l'inhibiteur du fuseau, durée du traitement;

— méthodes de préparation des lames;

— critères d'analyse des aberrations;

— nombre de cellules analysées par animal;

— critères pour conclure que l'étude est positive, négative ou équivoque.

Résultats:

— état de santé des animaux avant et pendant la période d'essai, y compris signes de toxicité;

— poids corporels et poids des organes, après euthanasie (si plusieurs traitements sont utilisés, poids corporels pendant le régime de traitement);

— signes de toxicité;

— indice mitotique;

— rapport des cellules de spermatogonies en mitose à celles se trouvant en premières et secondes métaphases méiotiques, ou autre preuve d'exposition du tissu cible;

— type et nombre d'aberrations, donnés séparément pour chaque animal;

— nombre total d'aberrations par groupe, moyenne et écart-type;

▼**M8**

— nombre de cellules présentant des aberrations par groupe, moyenne et écart-type;

— relation dose-réponse, si possible;

— analyses et méthodes statistiques employées;

— données des témoins négatifs concomitants;

— données des témoins négatifs historiques, y compris les plages, les moyennes, les écarts types, et limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson (le cas échéant), ou données publiées relatives aux témoins historiques utilisées pour déterminer l'acceptabilité des résultats de l'essai;

— données des témoins positifs concomitants;

— modifications de la ploïdie, le cas échéant, y compris les fréquences de polyploïdie et/ou de cellules endoredupliquées.

Discussion des résultats

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, N° 234, OCDE, Paris

(2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

(3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.

(4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.

(5) Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-15.

(6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379.Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. and Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.

(7) Cattanach, B.M., and Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.

(8) Cattanach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.

(9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.

▼**M8**

(10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313–324.

(11) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19–30.

(12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.

(13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.

(15) Hsu, T.C., Elder, F. and Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. Environ. Mutagen., 1, 291-294.

(16) Evans, E.P., Breckon, G., and Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.

(17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G.and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

(19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. Mutation Res., 723, 87-90.

(20) Warr T.J., Parry E.M. and Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, Mutation Res., 287, 29-46.

(21) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. Cancer Res., 43, 1362-1364.

(22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. Mutation Res., 119, 403-413.

▼**M8**

Appendice

DÉFINITIONS

Aneuploidy: any deviation from the normal diploid (or haploid) number of chromosomes by a single chromosome or more than one, but not by entire set(s) of chromosomes (polyploidy).

Centromere: Region(s) of a chromosome with which spindle fibers are associated during cell division, allowing orderly movement of daughter chromosomes to the poles of the daughter cells.

Produit chimique: une substance ou un mélange

Diversité chromosomique: diversité des formes de chromosomes (par exemple, métacentriques, acrocentriques, etc.) et de leur taille.

Aberration chromatidique: lésion chromosomique structurale se traduisant par une cassure d'une seule chromatide ou par une cassure et une réunion entre chromatides.

Aberration chromosomique: lésion chromosomique structurale se traduisant par une cassure, ou par une cassure et une réunion, des deux chromatides sur le même site.

Clastogène: produit chimique induisant des aberrations chromosomiques structurales dans des populations de cellules ou d'organismes.

Lacune: lésion achromatique inférieure à la largeur d'une chromatide, avec un défaut d'alignement minimal des chromatides.

Génotoxique: terme générique qualifiant tous les types de lésions de l'ADN ou des chromosomes, tels que les cassures, délétions, adduits, liaisons et modifications de nucléotides, réarrangements, mutations, aberrations chromosomiques et aneuploïdies. Tous les types d'effets génotoxiques n'entraînent pas nécessairement de mutations ou de lésions chromosomiques stables.

Indice mitotique (IM): nombre de cellules en métaphase divisé par le nombre total de cellules dans une population; une indication de la vitesse de prolifération cellulaire dans cette population.

Mitose: division du noyau cellulaire, généralement décomposée en prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase.

Mutagène: qui produit une modification héréditaire portant sur une ou plusieurs séquences de paires de bases d'ADN génique, ou sur la structure de chromosomes (aberrations chromosomiques).

Aberration numérique: modification du nombre de chromosomes par rapport au nombre normal caractéristique des animaux employés.

Polyploïdie: état multiple du nombre de chromosomes haploïde (n), autre que le nombre diploïde (c'est-à-dire $3n$, $4n$, etc.).

Aberration structurale: modification de la structure des chromosomes, détectable par un examen au microscope des cellules au stade de la métaphase et apparaissant sous la forme de délétions, cassures et échanges.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

UVCB: substances chimiques de composition inconnue ou variables, produits de réaction complexes et matières biologiques.

▼**M7**

_____

▼B

B.25. **TRANSLOCATION HÉRÉDITAIRE CHEZ LA SOURIS**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITION

Voir introduction générale, partie B.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Néant.

1.4. PRINCIPES DE LA MÉTHODE D'ESSAI

L'épreuve de translocation héréditaire chez la souris décèle des changements chromosomiques structurels et numériques dans les cellules germinales de mammifères tels qu'ils sont mis en évidence dans la descendance de première génération. Les types de changements chromosomiques détectés sont des translocations réciproques et, si la descendance femelle est incluse, la perte du chromosome X. Les porteurs de translocations et les femelles XO présentent une fertilité réduite permettant la sélection d'une descendance F_1 en vue d'une analyse cytogénétique. Une stérilité totale est due à certains types de translocations (autosome X et type c-t). Les translocations sont observées cytogénétiquement dans les cellules méiotiques en diacinèse-métaphase I des individus mâles, qu'il s'agisse de mâles F, ou de fils de femelles F_1. Les femelles XO sont identifiées cytogénétiquement par la présence de 39 chromosomes seulement dans des mitoses de la moelle osseuse.

1.5. CRITÈRE QUALITATIF

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparations

Les substances d'essai sont dissoutes dans une solution saline isotonique. Si elles sont insolubles dans l'eau, elles sont dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés. On utilise des solutions fraîchement préparées de la substance d'essai. Si un véhicule est utilisé pour faciliter le traitement, il ne doit pas interférer avec la substance d'essai et ne pas produire d'effets toxiques.

Voie d'administration

Les voies d'administration sont habituellement l'intubation orale ou l'injection intrapéritonéale. D'autres voies d'administration peuvent être appropriées.

Animaux d'expérience

Pour faciliter l'élevage et la vérification cytologique, ces expériences sont effectuées avec des souris. Aucune souche spécifique de souris n'est requise. Toutefois, la taille moyenne d'une portée de la souche utilisée devra être supérieure à 8 et être relativement constante.

Des animaux sains ayant atteint leur maturité sexuelle seront utilisés.

▼B

Nombre d'animaux

Le nombre d'animaux nécessaires dépend de la fréquence de translocations spontanées ainsi que du taux minimal d'induction requis pour un résultat positif.

L'essai consiste habituellement en une analyse de la descendance mâle F_1. Au moins 500 descendants mâles F_1 sont testés par groupe de dose. Si la descendance femelle F_1 est incluse, 300 mâles et 300 femelles sont nécessaires.

Contrôles

Des résultats de contrôles adéquats provenant d'épreuves réalisées simultanément et de contrôles historiques doivent exister. S'il existe des résultats acceptables de contrôles positifs provenant d'expériences récemment effectuées dans le même laboratoire, ces résultats peuvent être utilisés à la place de contrôles positifs simultanés.

Doses

Une dose est testée, il s'agit habituellement de la dose maximale associée à la production d'effets toxiques minimaux mais n'affectant pas le comportement reproducteur ou la survie. Pour établir une relation dose/réponse, deux autres doses plus faibles sont nécessaires. Dans le cas de substances non toxiques, on devrait avoir recours à une exposition à la dose maximale possible.

Conduite de l'essai

Traitement et accouplement

Deux programmes de traitement existent. L'administration unique de la substance d'essai est la méthode la plus fréquente. La substance d'essai peut également être administrée 7 jours sur 7 pendant 35 jours. Le nombre d'accouplements après traitement est déterminé par le programme de traitement et sera tel que tous les stades des cellules germinales traitées soient impliqués. À l'issue de la période d'accouplement, les femelles sont placées dans des cages individuelles. Lorsqu'elles ont mis bas, la date, la taille de la portée et le sexe des jeunes sont enregistrés. Toute la descendance mâle est sevrée et toute la descendance femelle est écartée à moins d'être incluse dans l'expérience.

Recherche des hétérozygotes de translocation

On utilise une des deux méthodes disponibles:

— analyse de la fécondité de la descendance F_1 et vérification ultérieure d'éventuels porteurs de translocations par analyse cytogénétique,

— analyse cytogénétique de tous les mâles F_1 sans sélection préalable par vérification de la fécondité.

a) Analyse de la fécondité:

La fécondité réduite d'un individu F_1 peut être déterminée en observant la taille de la portée et/ou en analysant le contenu utérin des partenaires femelles.

Il y a lieu de fixer les critères de détermination de la fécondité normale et réduite de la souche de souris utilisée.

▼B

Observation de la taille de la portée: Les mâles F_1 à tester sont placés dans des cages individuelles avec des femelles provenant soit de la même expérience soit de la colonie. Les cages sont inspectées quotidiennement à partir du dix-huitième jour qui suit l'accouplement. La taille de la portée et te sexe de la descendance F_2 sont enregistrés au moment de la naissance et les jeunes sont ensuite éliminés. Si la descendance femelle F_1 est testée, les descendants F_2 provenant de petites portées sont conservés en vue d'une analyse plus approfondie. Les femelles porteuses de translocation font l'objet d'une vérification par analyse cytogénétique d'une translocation dans n'importe lequel de leurs descendants mâles. Les femelles XO sont identifiées par la modification du rapport des sexes dans leur descendance, rapport qui passe de 1:1 à 1:2 mâles/femelles. Dans une méthode séquentielle, les animaux F_1 normaux ne font pas l'objet d'une autre vérification si la première portée F_2 atteint ou dépasse une valeur normale prédéterminée, sinon une deuxième ou une troisième portée F_2 sont observées. Les animaux F_1 qui ne peuvent pas être classés comme normaux après observation de jusqu'à trois portées F_2 maximum sont soit soumis à un nouveau contrôle par le biais d'une analyse du contenu utérin de leurs partenaires femelles soit directement soumis à une analyse cytogénétique.

Analyse du contenu utérin: La réduction de la taille des portées chez les porteurs de translocation est due à la mort des embryons, de sorte qu'un grand nombre d'implants morts indique la présence d'une translocation chez l'animal soumis au test. Chaque mâle F_1 à tester est accouplé à 2 ou 3 femelles. On constate la conception en examinant les femelles tous les matins afin de déceler la présence de bouchons vaginaux. Les femelles sont sacrifiées 14 à 16 jours plus tard et le nombre d'implants vivants et morts présents dans leur utérus est enregistré.

b) Analyse cytogénétique:

Les préparations de testicules sont effectuées par la méthode de séchage à l'air. Les porteurs de translocations sont identifiés par la présence de configurations multivalentes en diacinèse métaphase I dans les spermatocytes primaires. L'observation d'au moins 2 cellules présentant une association multivalente constitue la preuve nécessaire que l'animal testé est porteur d'une translocation.

Si aucune sélection par analyse de fécondité n'a été effectuée, tous les mâles F_1 sont soumis à un examen cytogénétique. Un minimum de 25 diacinèses métaphases I par mâle doivent être analysées au microscope. L'examen des métaphases mitotiques, des spermatogonies ou de la moelle osseuse est requise pour les mâles F_1 ayant de petits testicules et présentant un arrêt méiotique avant diacinèse ou pour les femelles F_1 suspectées d'être XO. La présence inhabituelle d'un chromosome long et/ou court dans 10 cellules est la preuve d'une translocation particulière entraînant la stérilité du mâle (type c-t). Quelques translocations X autosomes provoquant la stérilité du mâle peuvent uniquement être identifiées par une analyse des bandes de chromosomes mitotiques. La présence de 39 chromosomes dans 10 mitoses sur 10 est la preuve d'un état XO chez une femelle.

2. **RÉSULTATS**

Les résultats sont présentés sous forme de tableaux.

La taille moyenne des portées et le rapport entre les sexes sont enregistrés à la naissance et au sevrage pour chaque période d'accouplement.

▼B

Lors de l'évaluation de la fécondité des animaux de F_1, la taille moyenne des portées issues de tous les accouplements normaux ainsi que la taille individuelle des portées issues d'animaux F_1 porteurs de translocation sont présentées. En ce qui concerne l'analyse du contenu utérin, le nombre moyen d'implants vivants et morts issus d'accouplements normaux et le nombre d'implants vivants et morts pour chaque accouplement de porteurs de translocation F_1 sont notés.

Lors de l'analyse cytogénétique de la diacinèse-métaphase I, le nombre des différents types de configurations multivalentes et le nombre total de cellules sont relevés pour chaque porteur de translocation.

Pour les individus stériles F_1, le nombre total d'accouplements et la durée de la période d'accouplement sont indiqués. Le poids des testicules et les détails de l'analyse cytogénétique sont indiqués.

Pour les femelles XO, on indique la taille moyenne de la portée, le rapport entre les sexes dans la descendance F_2 ainsi que les résultats de l'analyse cytogénétique.

Si d'éventuels porteurs de translocation F_1 sont présélectionnés par des tests de fécondité, les tableaux mentionneront combien parmi eux ont été confirmés comme étant des hétérozygotes de translocation.

Les données relatives aux témoins négatifs ainsi que les expériences témoins positives sont présentées.

3. **RAPPORT**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

— souche de souris, âge des animaux, poids des animaux traités,

— nombre d'animaux parents de chaque sexe dans les groupes traités et témoins,

— conditions d'essai, description détaillée du traitement, doses, solvants, programme d'accouplement,

— nombre et sexe des jeunes par femelle, nombre et sexe des jeunes élevés en vue d'une analyse de translocation,

— moment et critères de l'analyse de translocation,

— nombre et description détaillée des porteurs de translocation, y compris données relatives à l'élevage et au contenu utérin, si possible,

— méthodes cytogénétiques et détails de l'analyse microscopique, de préférence avec clichés,

— évaluation statistique,

— discussion des résultats,

— interprétation des résultats.

▼B

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

▼B

B.26. **ESSAI DE TOXICITÉ SUBCHRONIQUE PAR VOIE ORALE TOXICITÉ ORALE À DOSES RÉPÉTÉES — RONGEURS: 90 JOURS**

1. **MÉTHODE**

La méthode décrite pour cet essai de toxicité orale subchronique reprend la ligne directrice n° 408 de l'OCDE (1998).

1.1. INTRODUCTION

Lors de l'appréciation et de l'évaluation des caractéristiques toxiques d'un produit chimique, la détermination de la toxicité subchronique par voie orale à doses répétées peut s'effectuer après avoir obtenu des informations préliminaires sur la toxicité à partir d'essais de toxicité aigué ou à doses répétées sur 28 jours. L'étude sur 90 jours fournit des informations sur les dangers que peut entraîner pour la santé une exposition réitérée durant une période prolongée, période qui s'étend du sevrage jusqu'à l'état adulte. L'étude fournira des informations sur les principaux effets toxiques, indiquera les organes cibles et les possibilités d'accumulation et pourra donner une estimation de la dose sans effet toxique (NOAEL) qui pourra être utilisée pour sélectionner des doses en vue d'études chroniques et pour établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine.

La méthode accorde davantage d'importance aux effets neurologiques et donne des indications relatives aux effets sur le système immunitaire et sur la reproduction. Elle insiste également sur la nécessité d'observer très attentivement les animaux sur le plan clinique, en vue d'obtenir le plus d'informations possible. Cette étude devrait permettre de repérer les produits chimiques susceptibles d'avoir une action neurotoxique ou des effets sur le système immunitaire ou les organes reproducteurs, pouvant justifier des études plus approfondies.

Voir également introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Dose: quantité de substance d'essai administrée. La dose est exprimée en poids (g, mg), en poids de substance d'essai par unité de poids corporel de l'animal d'expérience (par exemple, mg/kg) ou en concentration constante dans la nourriture (ppm).

Dosage: terme général recouvrant la dose, sa fréquence et la durée de l'administration.

DSET: abréviation de dose sans effet toxique (NOAEL: No Observable Adverse Effect Level}, c'est-à-dire la dose la plus élevée à laquelle aucun effet nocif lié au traitement n'est observé.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Différentes doses de la substance d'essai sont administrées quotidiennement par voie orale à plusieurs groupes d'animaux de laboratoire, à raison d'un niveau de dose par groupe et ce pendant une période de 90 jours. Les animaux sont observés attentivement pendant la période d'administration afin de déceler d'éventuels signes de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont sacrifiés au cours de l'essai sont autopsiés: au terme de l'essai, les animaux suivants sont également sacrifiés et autopsiés.

▼B

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.4.1. **Préparation des animaux**

Il convient d'utiliser des animaux en bonne santé, ayant été acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours et qui n'ont pas encore été sujets d'expériences. L'espèce, la race, la source, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience doivent être précisés. Les animaux seront répartis au hasard entre les groupes traités et les groupes témoins. Les cages doivent être placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats de l'étude soit réduite au minimum. Un numéro d'identification unique est attribué à chaque animal.

1.4.2. **Préparation des doses**

La substance d'essai est administrée par gavage ou dans les aliments ou dans l'eau de boisson. Le mode d'administration par voie orale dépend de l'objectif de l'étude et des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai.

S'il y a lieu, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. On recommande, chaque fois que les circonstances le permettent, d'envisager d'abord l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse, ensuite une solution ou une émulsion dans une huile (par exemple l'huile de maïs) et en dernier lieu une solution dans d'autres véhicules. La toxicité des véhicules autres que l'eau doit être connue. La stabilité de la substance d'essai dans les conditions d'administration doit être déterminée.

1.4.3. **Conditions d'essai**

1.4.3.1. *Animaux d'expérience*

L'espèce préférée est le rat, bien que d'autres espèces de rongeurs, notamment la souris, puissent être utilisées. Il convient d'employer de jeunes animaux adultes, sains, issus de souches de laboratoire courantes. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. L'administration doit commencer dès que possible après le sevrage et en aucun cas au-delà de l'âge de 9 semaines. Au début de l'étude, les différences de poids entre les animaux utilisés doivent être minimales et ne pas excéder ± 20 % de la moyenne du poids de chaque sexe. Lorsque l'essai est conduit à titre d'étude préliminaire à une étude de toxicité chronique à long terme, il faut utiliser des animaux issus de la même souche et de la même source dans les deux études.

1.4.3.2. *Nombre et sexe*

Au moins 20 animaux (10 femelles et 10 mâles) doivent être utilisés pour chaque dose. Si on a prévu de sacrifier des animaux en cours d'essai, il convient d'accroître ce nombre du nombre d'animaux qui doivent être sacrifiés en cours d'essai. En fonction des connaissances dont on dispose au préalable sur le produit chimique ou sur un produit de structure très proche, on pourra envisager d'inclure un groupe satellite supplémentaire de 10 animaux (5 par sexe) dans le groupe témoin et dans le groupe traité à la plus forte dose, afin d'observer, une fois la période de traitement terminée, la persistance ou la réversibilité de tout effet toxique. La durée de cette période post-traitement devrait être fixée en fonction des effets observés.

▼B

1.4.3.3. *Niveaux de dose*

Il faut utiliser au minimum trois doses et un groupe témoin, sauf si un essai limite est pratiqué (voir paragraphe 1.4.3.4). Les niveaux de dose peuvent être établis en fonction des résultats obtenus lors d'études à doses répétées ou d'études préliminaires et doivent tenir compte de toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques disponibles sur la substance d'essai ou de substances apparentées. Sauf contraintes dues aux propriétés physico-chimiques de la substance ou à ses effets biologiques, la dose la plus élevée doit être choisie en vue de provoquer un effet toxique, mais ni la mort ni d'intenses souffrances. Une série de doses décroissantes doit être sélectionnée en vue de mettre en évidence tout effet lié à la dose ainsi qu'une dose sans effet toxique (DSET) à la dose la plus faible. Des intervalles correspondant à un facteur 2 ou 4 sont souvent les plus appropriés entre les doses décroissantes et l'inclusion d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation de très grands intervalles (par exemple séparés par un facteur supérieur à 6-10) entre les doses.

Le groupe témoin sera un groupe non traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance à tester, les animaux du groupe témoin doivent être traités de la même manière que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé. Si la substance d'essai est incorporée aux aliments et qu'elle entraîne une diminution de la prise de nourriture, il peut être utile d'utiliser un groupe témoin nourri en parallèle afin de déterminer si la diminution est due aux caractéristiques organoleptiques ou à des altérations toxicologiques du modèle d'essai.

Il convient également d'être attentif aux caractéristiques suivantes du véhicule ou d'autres additifs, selon le cas: effets sur l'absorption, la distribution, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité; et effets sur la consommation alimentaire et hydrique ou sur l'état nutritionnel des animaux.

1.4.3.4. *Essai limite*

Si un essai pratiqué avec une seule dose équivalant à au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, en suivant le mode opératoire décrit pour cette étude, ne produit aucun effet nocif observé et s'il n'y a pas de raison de penser que la substance soit toxique compte tenu des données dont on dispose au sujet de substances ayant une structure analogue, on peut considérer qu'il n'est pas nécessaire de réaliser une étude complète avec trois niveaux de dose. L'essai limite est valable sauf dans le cas où l'exposition humaine puisse advenir à des doses plus élevées.

1.5. MODE OPÉRATOIRE

1.5.1. **Administration des doses**

Les animaux reçoivent une administration quotidienne de la substance d'essai, sept jours sur sept, durant 90 jours. Tout autre régime d'administration, par exemple cinq jours par semaine, doit être justifié. Lorsque la substance d'essai est administrée par gavage, une dose unique devrait être dispensée aux animaux par une sonde gastrique ou une canule d'intubation appropriée. Le volume maximal de liquide administrable en une fois dépend de la taille de l'animal. Le volume ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas des solutions aqueuses où il peut aller jusqu'à 2 ml/100 g de poids corporel. Sauf pour les substances irritantes ou corrosives, qui provoqueront normalement des effets exacerbés aux concentrations plus élevées, il convient de réduire au minimum la variabilité du volume d'essai en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à toutes les doses.

▼B

Si la substance d'essai est administrée dans les aliments ou l'eau de boisson, il importe de s'assurer que sa quantité n'interfère pas avec la nutrition normale ni avec l'équilibre hydrique. Lorsque la substance d'essai est incorporée aux aliments, on peut soit appliquer une concentration constante dans les aliments (ppm), soit une dose constante par rapport au poids corporel de l'animal; il y a lieu de spécifier la méthode utilisée. Si la substance est administrée par gavage, la dose doit être administrée à la même heure chaque jour et ajustée si nécessaire pour rester constante par rapport au poids corporel de l'animal. Lorsqu'une étude sur 90 jours sert de préliminaire à une étude de toxicité chronique à long terme, un régime alimentaire semblable doit être utilisé dans les deux études.

1.5.2. **Observations**

La période d'observation doit durer au moins 90 jours. Les animaux d'un groupe satellite destinés à des observations ultérieures ne doivent recevoir aucun traitement pendant une période appropriée pour que l'on puisse constater la persistance ou la disparition des effets toxiques.

Il faudra effectuer un examen clinique général au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en tenant compte de la période après l'administration pour laquelle des effets observables les plus marqués sont prévisibles. L'état clinique des animaux doit être noté. Deux fois par jour au minimum, généralement au début et à la fin de chaque journée, tous les animaux doivent être examinés afin de déceler des symptômes de morbidité et de mortalité.

Un examen clinique détaillé doit être pratiqué sur tous les animaux au moins une fois avant la première exposition (pour pouvoir effectuer des comparaisons sur un même individu), et ensuite une fois par semaine. Ces examens doivent être effectués hors de la cage, de préférence dans une enceinte normalisée, et à heure fixe. Ils doivent être soigneusement consignés, de préférence en utilisant un système de notation explicitement défini par le laboratoire qui réalise l'essai. Les conditions d'observation doivent demeurer aussi constantes que possible. Les symptômes relevés devraient inclure, de façon non limitative, les changements affectant la peau, la fourrure, les yeux, les muqueuses, la fréquence des sécrétions et des excrétions ainsi que l'activité autonome (sécrétion de larmes, horripilation, diamètre de la pupille, respiration anormale). Il convient également de noter les changements dans la démarche, le maintien et les réactions à la manipulation ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, de stéréotypes (par exemple, soins corporels excessifs, animaux tournant en rond de façon répétitive) et de comportements bizarres (par exemple, automutilation, marche à reculons) (1).

À l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un appareillage approprié équivalent, il y a lieu d'effectuer, avant l'administration de la substance à tester et au terme de l'étude, un examen ophtalmologique, de préférence sur tous les animaux mais au minimum sur le groupe d'animaux exposés à la dose la plus élevée et sur le groupe témoin. Si on décèle des changements dans les yeux de ces animaux, tous les autres animaux doivent être examinés.

Vers la fin de la période d'exposition, mais en aucun cas avant la onzième semaine, il faut vérifier la réactivité sensorielle à différents types de stimuli (1) (auditifs, visuels et proprioceptifs, par exemple) (2) (3) (4), et évaluer la force de préhension (5) et l'activité motrice (6). Des détails supplémentaires sur les méthodes utilisables figurent dans les références respectives. Des méthodes non décrites dans les références peuvent aussi être appliquées.

Les observations fonctionnelles préconisées vers la fin de l'étude ne sont pas indispensables si on dispose d'observations fonctionnelles provenant d'autres études et que les examens cliniques quotidiens n'ont pas révélé de troubles fonctionnels.

▼B

Exceptionnellement, les observations fonctionnelles peuvent aussi être omises pour des groupes qui par ailleurs présentent des symptômes de toxicité à un degré tel qu'ils interféreraient sensiblement avec le déroulement de l'essai fonctionnel.

1.5.2.1. *Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau*

Tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine. On mesurera la consommation de nourriture au moins une fois par semaine. Si la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la consommations d'eau doit aussi être mesurée au moins une fois par semaine. Il est également recommandé de mesurer la consommation d'eau, dans le cas d'étude où la substance d'essai est administrée dans les aliments ou par gavage, si celle-ci risque d'être modifiée.

1.5.2.2. *Hématologie et biochimie clinique*

Des prélèvements de sang doivent être pratiqués à des sites déterminés et les échantillons, stockés, s'il y a lieu, dans des conditions appropriées. À la fin de la période d'essai, des prélèvements sont réalisés juste avant le sacrifice des animaux ou au cours de celui-ci.

On procédera aux examens hématologiques suivants au terme de la période d'essai et sur les prises de sang effectuées en cours d'essai, le cas échéant: hématocrite, concentration d'hémoglobine, numération des érythrocytes et des leucocytes, formule leucocytaire, numération des plaquettes et mesure du temps de coagulation.

Les analyses de biochimie clinique destinées à étudier les principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur les reins et le foie, devraient être pratiquées sur des échantillons de sang prélevés sur chaque animal juste avant son sacrifice ou au cours de celui-ci (à l'exception des animaux trouvés moribonds et/ou sacrifiés avant la fin de l'essai). A l'instar des examens hématologiques, les analyses de biochimie clinique peuvent être conduites sur des échantillons de sang prélevés en cours d'essai. Il est recommandé de faire jeûner les animaux durant la nuit qui précède la prise de sang ([1]). Les analyses effectuées sur le plasma ou le sérum devraient comprendre le sodium, le potassium, le glucose, le cholestérol total, l'urée, l'azote uréique du sang, la créatinine, les concentrations totales de protéines et d'albumine et plus de deux enzymes indicatrices des effets hépatocellulaires (telles que l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase, la phosphatage alcaline, la gamma glutarmyle transpeptidase et la sorbitol déshydrogenase). Des mesures d'activités enzymatiques supplémentaires (d'origine hépatique ou autre) et des acides biliaires, susceptibles de fournir des informations utiles dans certaines circonstances, peuvent également être incluses.

Les analyses d'urine suivantes peuvent être réalisées, à titre facultatif, au cours de la dernière semaine de l'étude sur des échantillons d'urine prélevés à des moments déterminés: apparence, volume, osmolalité ou densité, pH, protéines, glucose, sang et cellules sanguines.

Il faut envisager par ailleurs de rechercher les indicateurs sériques de lésions générales des tissus. Si les propriétés connues de la substance d'essai risquent ou sont soupçonnées d'affecter des courbes métaboliques connexes, d'autres analyses devraient être pratiquées, notamment celles du calcium, du phosphore, des triglycérides à jeun, d'hormones spécifiques, de la méthémoglobine et de la cholinestérase. Ces analyses doivent être définies pour certaines classes de produits chimiques ou au cas par cas.

([1]) Pour un certain nombre de paramètres mesurés dans le sérum ou le plasma, et particulièrement pour le glucose, il est préférable de faire jeûner les animaux durant la nuit qui précède la prise de sang, et ce essentiellement afin d'éviter l'accroissement de variabilité qui découlerait inévitablement de la prise de nourriture et qui aurait tendance à masquer des effets plus subtils, rendant de ce fait l'interprétation difficile. Cependant, le jeûne des animaux durant une nuit entière peut influer sur leur métabolisme général et risque, notamment dans les études où la substance d'essai est administrée dans la nourriture, de perturber l'exposition quotidienne à la substance d'essai. Si on a choisi de faire jeûner les animaux toute la nuit, les analyses de biochimie clinique doivent être réalisées après les observations fonctionnelles de l'étude.

▼B

Il convient d'une façon générale de suivre une démarche souple, adaptée à l'espèce et aux effets observés et/ou escomptés d'une substance donnée.

Si les données historiques sont insuffisantes, il y a lieu d'envisager la détermination de paramètres d'hématologie et de biochimie clinique avant de commencer l'étude; il est généralement déconseillé d'obtenir ces données avant le traitement (7).

1.5.2.3. *Autopsie*

Tous les animaux de l'étude feront l'objet d'une autopsie complète et détaillée, comportant l'examen attentif de la surface externe du corps, de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Le foie, les reins, les glandes surrénales, les testicules, les épididymes, l'utérus, les ovaires, le thymus, la rate, le cerveau et le cœur de tous les animaux (à l'exception des animaux moribonds et/ou sacrifiés avant la fin de l'essai) doivent être disséqués et pesés à l'état frais dès que possible afin d'éviter leur dessiccation.

Les tissus suivants doivent être conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu: tous les organes présentant des lésions macroscopiques, l'encéphale (les régions représentatives du cerveau, du cervelet, de la moelle et du pont), la moelle épinière (à trois niveaux: cervical, médio-thoracique et lombaire), l'hypophyse, la thyroïde, les glandes parathyroïdes, le thymus, l'œsophage, les glandes salivaires, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin (y compris les plaques de Peyer), le foie, le pancréas, les reins, les glandes surrénales, la rate, le cœur, la trachée et les poumons (traités par gonflement avec un fixateur, puis immergés), l'aorte, les gonades, l'utérus, les organes génitaux auxiliaires, les glandes mammaires des femelles, la prostate, la vessie, la vésicule biliaire (souris), les ganglions lymphatiques (de préférence un ganglion lymphatique faisant partie du territoire de drainage dont dépend la voie d'administration et un autre faisant partie d'un autre territoire de drainage afin de détecter les éventuels effets systémiques), les nerfs périphériques (sciatique ou poplité interne) de préférence proche du muscle, un prélèvement de moelle osseuse (et/ou ponction de moelle osseuse examinée directement), la peau et les yeux (si des changements ont été relevés au cours des examens ophtalmologiques). Les observations cliniques et les observations macroscopiques peuvent conduire à l'examen de tissus supplémentaires. Tous les organes considérés comme des cibles vraisemblables de la substance d'essai, compte tenu de ses propriétés, devraient également être conservés.

1.5.2.4. *Histopathologie*

Un examen histopathologique complet doit être pratiqué sur les tissus et organes conservés de tous les animaux appartenant au groupe témoin et au groupe traité à la dose la plus élevée. Si des changements liés au traitement sont constatés dans le groupe traité à la dose la plus élevée, il faudra étendre cet examen aux animaux de tous les groupes traités.

Toutes les lésions macroscopiques doivent être examinées.

Si un groupe satellite est inclus, les tissus et organes sur lesquels des effets ont été observés dans les groupes traités doivent faire l'objet d'un examen histopathologique.

▼B

2. **RÉSULTATS ET RAPPORT**

2.1. RÉSULTATS

Les résultats correspondant à chaque animal doivent être fournis. En outre, tous les résultats doivent être résumés sous forme de tableaux faisant apparaître, pour chaque groupe d'essai, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, le moment de la mort ou du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité et une description des symptômes de toxicité observés, notamment le moment de leur apparition, leur durée et leur gravité, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions et le pourcentage d'animaux affecté par chaque type de lésion.

S'il y a lieu, les résultats numériques doivent être évalués par une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Le choix des méthodes statistiques et des résultats à analyser doit intervenir au stade de rédaction du protocole d'étude.

2.2. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

2.2.1. **Substance d'essai**

— État physique, pureté et propriétés physico-chimiques,

— données permettant l'identification chimique,

— véhicule (le cas échéant) justification du choix du véhicule, s'il est autre que l'eau.

2.2.2. **Animaux d'expérience**

— Espèce et souche utilisée,

— nombre, âge et sexe des animaux.

— source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,

— poids de chaque animal au début de l'essai.

2.2.3. **Conditions d'essai**

— Justification du choix des doses,

— détails concernant la préparation contenant la substance d'essai, son incorporation dans la nourriture, la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation,

— détails relatifs à l'administration de la substance d'essai,

— doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et facteur de conversion de la concentration de la substance d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson (en ppm) en dose réelle, s'il y a lieu,

— détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau.

2.2.4. **Résultats**

— Poids corporel et variation de poids corporel,

— consommation de nourriture et d'eau, le cas échéant,

— données sur la réponse toxique par sexe et par dose et description des signes de toxicité,

▼B

— nature, gravité et durée des observations cliniques (réversibles ou non),

— résultats de l'examen ophtalmologique,

— évaluations de l'activité sensorielle, la force de préhension et l'activité motrice (le cas échéant),

— paramètres hématologiques et valeurs normales de référence,

— paramètres de biochimie clinique et valeurs normales de référence,

— poids du corps et des organes des animaux à leur mort et rapports poids de l'organe/poids corporel,

— résultats d'autopsie,

— description détaillée de tous les résultats histopathologiques,

— données relatives à l'absorption, le cas échéant,

— traitement statistique des résultats, s'il y a lieu.

Discussion des résultats.

Conclusions.

3. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.

(2) Tupper, D. E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, pp. 999-1003.

(3) Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use m Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, pp. 691-704.

(4) Moser, V. C, Mc Daniel, K. M., Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol, 10S, pp. 267-283.

(5) Meyer O. A, Tilson H. A., Byrd W. C, Riley M. T. (1979). A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hindlimb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, pp. 233-236.

(6) Crofton K. M., Howard J. L, Moser V. C, Gill M. W., Reiter L. W., Tilson H. A., MacPhail R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, pp. 599-609.

(7) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). «Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies», Fundam. & Appl. Toxicol, 29, pp. 198-201.

▼B

B.27. **ESSAI DE TOXICITÉ SUBCHRONIQUE PAR VOIE ORALE TOXICITÉ ORALE À DOSES RÉPÉTÉES NON-RONGEURS: 90 JOURS**

1. **MÉTHODE**

La méthode décrite pour cet essai de toxicité orale subchronique reprend la ligne directrice n° 409 de l'OCDE (1998).

1.1. INTRODUCTION

Lors de l'appréciation et de l'évaluation des caractéristiques toxiques d'un produit chimique, la détermination de la toxicité subchronique par voie orale à doses répétées peut s'effectuer après avoir obtenu des informations préliminaires sur la toxicité à partir d'essais de toxicité aiguë ou à doses répétées sur 28 jours. L'étude sur 90 jours fournit des informations sur les dangers que peut entraîner pour la santé une exposition réitérée durant une période de croissance rapide jusqu'au début de l'âge adulte. L'étude fournira des informations sur les principaux effets toxiques, indiquera les organes cibles et les possibilités d'accumulation et pourra donner une estimation de la dose sans effet toxique (NOAEL) qui pourra être utilisée pour sélectionner des doses en vue d'études chroniques et pour établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine.

La méthode d'essai permet de mettre en évidence les effets nocifs de l'exposition aux produits chimiques chez des non-rongeurs; elle ne doit être utilisée que dans les cas suivants:

— lorsque les effets observés dans d'autres études font ressortir la nécessité d'éclaircir et de préciser certains points chez une deuxième espèce non-rongeurs, ou

— lorsque les études toxicocinétiques montrent que l'utilisation d'une espèce particulière de non-rongeur constitue le choix le plus pertinent en tant qu'animal d'expérience, ou

— lorsque d'autres raisons précises justifient l'utilisation d'une espèce de non-rongeur.

Voir également introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Dose: quantité de substance d'essai administrée. La dose est exprimée en poids (g, mg), en poids de substance d'essai par unité de poids corporel de l'animal d'expérience (par exemple, mg/kg) ou en concentration constante dans la nourriture (ppm).

Dosage: terme général recouvrant la dose, sa fréquence et la durée de l'administration.

DSET: abréviation de dose sans effet toxique (NOAEL: No Observable Adverse Effect Level), c'est-à-dire la dose la plus élevée à laquelle aucun effet nocif lié au traitement n'est observé.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Différentes doses de la substance d'essai sont administrées quotidiennement par voie orale à plusieurs groupes d'animaux de laboratoire, à raison d'une valeur de dose par groupe et ce pendant une période de 90 jours. Pendant la période d'administration, les animaux sont observés attentivement afin de déceler d'éventuels symptômes de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont sacrifiés en cours d'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont également sacrifiés et autopsiés.

▼B

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.4.1. **Sélection de l'espèce animale**

L'espèce non-rongeur couramment utilisée est le chien, dont la race doit être définie; on se sert fréquemment du beagle. D'autres espèces, par exemple le porc ou le porc nain (mini porc), peuvent aussi être utilisées. Les primates ne sont pas recommandés et leur utilisation doit être justifiée. Il convient d'employer de jeunes animaux en bonne santé et, dans le cas du chien, l'administration de la substance à tester devrait commencer de préférence à l'âge de 4-6 mois, et jamais au delà de 9 mois. Lorsque l'étude est préliminaire à une étude de toxicité chronique à long terme, il faut utiliser la même espèce et la même race dans les deux études.

1.4.2. **Préparation des animaux**

Il convient d'utiliser de jeunes animaux, en bonne santé, acclimatés aux conditions du laboratoire et n'ayant pas encore été sujets d'expérience. La durée de l'acclimatation dépendra de l'espèce d'essai sélectionnée et de sa provenance. Il est recommandé de compter au moins 5 jours pour les chiens ou les porcs élevés à cette fin dans une animalerie résidente et au moins deux semaines pour ces mêmes animaux s'ils proviennent de sources extérieures. L'espèce, la race, la source, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience doivent être précisés. Les animaux seront répartis au hasard entre les groupes traités et le groupe témoin. Les cages doivent être placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats soit réduite au minimum. Un numéro d'identification distinct doit être attribué à chaque animal.

1.4.3. **Préparation des doses**

La substance à tester peut être administrée dans la nourriture ou dans l'eau de boisson, par gavage ou dans des capsules. Le mode d'administration par voie orale dépend de l'objectif de l'étude et des propriétés physicochimiques de la substance d'essai.

S'il y a lieu, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. On recommande, chaque fois que les circonstances le permettent, d'envisager d'abord l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse, ensuite une solution ou une émulsion dans une huile (par exemple l'huile de maïs) et en dernier lieu une solution dans d'autres véhicules. La toxicité des véhicules autres que l'eau doit être connue. La stabilité de la substance d'essai dans les conditions d'administration doit être déterminée.

1.5. MODE OPÉRATOIRE

1.5.1. **Nombre et sexe des animaux**

Il faut employer au moins 8 animaux (4 femelles et 4 mâles) à chaque dose. Si on a prévu de sacrifier des animaux en cours d'essai, il convient d'accroître ce nombre du nombre d'animaux qui doivent être sacrifiés en cours d'essai. Le nombre d'animaux survivants au terme de l'étude doit être suffisant pour permettre une évaluation significative des effets toxiques. En fonction des connaissances dont on dispose au préalable sur le produit chimique ou sur une substance de structure très proche, on envisagera d'inclure un groupe satellite supplémentaire de 8 animaux (4 par sexe) dans le groupe témoin et dans le groupe traité à la concentration la plus élevée, en vue d'observer, une fois la période de traitement écoulée, la réversibilité ou la persistance de tout effet toxique. La durée de cette période post-traitement doit être fixée en fonction des effets observés.

▼B

1.5.2. **Dosage**

Il faut utiliser au minimum 3 doses et un groupe témoin, sauf si un essai limite est pratiqué (voir paragraphe 1.5.3). Les niveaux de dose peuvent être établis en fonction des résultats obtenus lors d'études à doses répétées d'études préliminaires et doivent tenir compte de toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques disponibles sur la substance d'essai ou de substances apparentées. Sauf contraintes dues aux propriétés physico-chimiques de la substance d'essai ou par ses effets biologiques, la dose la plus élevée doit être choisie en vue de provoquer un effet toxique, mais ni la mort ni d'intenses souffrances. Une série de doses décroissantes doit être sélectionnée en vue de mettre en évidence tout effet lié à la dose ainsi qu'une dose sans effet toxique (DSET) à la dose la plus faible. Des intervalles correspondant à un facteur 2 ou 4 sont souvent les plus appropriés entre les doses décroissantes et l'inclusion d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation de très grands intervalles (par exemple séparés par un facteur supérieur à 6-10) entre les doses.

Le groupe témoin sera un groupe non traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance à tester, les animaux du groupe témoin doivent être traités de la même manière que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé. Si la substance d'essai est incorporée aux aliments et qu'elle entraîne une diminution de la prise de nourriture, il peut être utile d'utiliser un groupe témoin nourri en parallèle afin de déterminer si la diminution est duc aux caractéristiques organoleptiques ou à des altérations lexicologiques du modèle d'essai.

Il convient également d'être attentif aux caractéristiques suivantes du véhicule ou d'autres additifs, selon le cas effets sur l'absorption, la distribution, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai, effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité, et effets sur la consommation alimentaire et hydrique ou sur l'état nutritionnel des animaux.

1.5.3. **Essai limite**

Si un essai pratiqué avec une seule dose équivalant à au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, en suivant le mode opératoire décrit pour cette étude, ne produit aucun effet nocif observé et s'il n'y a pas de raison de penser que la substance soit toxique compte tenu des données dont on dispose au sujet de substances ayant une structure analogue, on peut considérer qu'il n'est pas nécessaire de réaliser une étude complète avec trois niveaux de dose. L'essai limite est valable sauf dans le cas où l'exposition humaine puisse advenir à des doses plus élevées.

1.5.4. **Administration des doses**

Les animaux reçoivent une administration quotidienne de la substance d'essai, sept jours sur sept, durant 90 jours. Tout autre régime d'administration, par exemple 5 jours par semaine, doit être justifié. Lorsque la substance d'essai est administrée par gavage, une dose unique devrait être dispensée aux animaux par une sonde gastrique ou une canule d'intubation appropriée. Le volume maximal de liquide administrable en une fois dépend de la taille de l'animal. Le volume devrait normalement être le plus petit possible. Sauf pour les substances irritantes ou corrosives, qui provoqueront normalement des effets exacerbés aux concentrations plus élevées, il convient de réduire au minimum la variabilité du volume d'essai en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à toutes les doses.

▼B

Si la substance d'essai est administrée dans les aliments ou l'eau de boisson, il importe de s'assurer que sa quantité n'interfère pas avec la nutrition normale ni avec l'équilibre hydrique. Lorsque la substance d'essai est incorporée aux aliments, on peut soit appliquer une concentration constante dans les aliments (ppm), soit une dose constante par rapport au poids corporel de l'animal; il y a lieu de spécifier la méthode utilisée. Si la substance est administrée par gavage ou dans une capsule, la dose doit être administrée aux mêmes heures chaque jour et ajustée si nécessaire pour rester constante par rapport au poids corporel de l'animal. Lorsqu'une étude sur 90 jours sert de préliminaire à une étude de toxicité chronique à long terme, un régime alimentaire semblable doit être utilisé dans les deux études.

1.5.5. **Observations**

La période d'observation doit durer au moins 90 jours. Les animaux d'un groupe satellite destinés à des observations ultérieures ne doivent recevoir aucun traitement pendant une période appropriée pour que l'on puisse constater la persistance ou la disparition des effets toxiques.

Il faudra effectuer un examen clinique général au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en tenant compte de la période après l'administration pour laquelle des effets observables les plus marqués sont prévisibles. L'état clinique des animaux doit être noté. Au moins deux fois par jour, généralement au début et à la fin de chaque journée, tous les animaux doivent être examinés afin de déceler des symptômes de morbidité et de mortalité.

Un examen clinique détaillé doit être pratiqué sur tous les animaux au moins une fois avant la première exposition (pour pouvoir effectuer des comparaisons sur un même individu), et ensuite une fois par semaine. Ces examens doivent être effectués, si possible, hors de la cage, de préférence dans une enceinte normalisée, et à heure fixe. Les conditions d'observation doivent demeurer aussi constantes que possible. Les symptômes de toxicité doivent être soigneusement notés, notamment le moment de leur apparition, leur durée et leur gravité. Les observations devraient inclure, de façon non limitative, les changements affectant la peau, la fourrure, les yeux, les muqueuses, la fréquence des sécrétions et des excrétions ainsi que l'activité autonome (par exemple, sécrétion de larmes, horripilation, diamètre de la pupille, respiration anormale). Il convient également de noter les changements dans la démarche, le maintien et les réactions à la manipulation ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, de stéréotypes (par exemple, soins corporels excessifs, animaux tournant en rond de façon répétitive) et de comportements bizarres.

À l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un appareillage approprié équivalent, il y a lieu d'effectuer, avant l'administration de la substance à tester et au terme de l'étude, un examen ophtalmologique, de préférence sur tous les animaux mais au minimum sur le groupe d'animaux exposés à la dose la plus élevée et sur le groupe témoin. Si on décèle des changements liés au traitement dans les yeux de ces animaux, tous les autres animaux doivent être examinés.

1.5.5.1. *Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau*

Tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine. On mesurera la consommation de nourriture au moins une fois par semaine. Si la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la consommation d'eau doit aussi être mesurée au moins une fois par semaine. Il est également recommandé de mesurer la consommation d'eau, dans le cas d'étude où la substance d'essai est administrée dans les aliments ou par gavage, si celle-ci risque d'être modifiée.

▼B

1.5.5.2. *Hématologie et biochimie clinique*

Des prélèvements de sang doivent être pratiqués à des sites déterminés et les échantillons, stockés, s'il y a lieu, dans des conditions appropriées. À la fin de la période d'essai, des échantillons sont prélevés juste avant le sacrifice des animaux ou au cours de celui-ci.

Au début de l'essai et, par la suite, soit tous les mois, soit à partir du milieu de la période d'essai et à la fin de celle-ci, il y a lieu d'effectuer un examen hématologique en mesurant l'hématocrite, la concentration d'hémoglobine, la numération des érythrocytes et des leucocytes, la formule leucocytaire, la numération des plaquettes et l'étude de paramètres de la coagulation tels que le temps de coagulation, le temps de prothrombine ou le temps de thromboplastine.

Des analyses de biochimie clinique destinées à l'étude des principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur les reins et le foie, devraient être pratiquées sur des échantillons de sang prélevés sur tous les animaux, au début de l'essai et ensuite soit tous les mois, soit au milieu et à la fin de l'essai. Les paramètres qui doivent être analysés comprennent l'équilibre électrolytique, le métabolisme des glucides et les fonctions hépatiques et rénales. Le choix de certaines analyses dépendra des observations sur le mode d'action de la substance d'essai. Les animaux doivent être mis à jeun durant une période dépendant de l'espèce la prise de sang. Les analyses proposées comprennent le calcium, le phosphore, le chlore, le sodium, le potassium, le glucose à jeun, l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase, l'ornithine décarboxylase, la gamma glutamyle transpeptidase, l'azote uréique, l'albumine, la créatinine sanguine et les concentrations totales de bilirubine et de protéines sériques.

Les analyses d'urine doivent être pratiquées au moins au début, au milieu et en fin d'essai, sur des échantillons d'urine prélevés à des moments déterminés. Les paramètres à relever sont l'apparence, le volume, l'osmolalité ou la densité, le pH, les protéines, le glucose, le sang et les cellules sanguines. Des paramètres supplémentaires peuvent être étudiés, s'il y a lieu, afin d'élargir le champ des effets observés.

Il faudrait envisager par ailleurs de rechercher des indicateurs de lésions générales des tissus. D'autres déterminations pourraient être nécessaires à une évaluation toxicologique adéquate: l'analyse des lipides, des hormones, de l'équilibre acido-basique, de la méthémoglobine et de l'inhibition de la cholinestérase. Des analyses de biochimie clinique supplémentaires peuvent être pratiquées, s'il y a lieu, afin d'élargir le champ des effets observés. Celles-ci doivent être définies pour certaines classes de produits chimiques ou cas par cas.

Il convient d'une façon générale de suivre une démarche souple, adaptée à l'espèce et aux effets observés et/ou escomptés d'une substance donnée.

1.5.5.3. *Autopsie*

Tous les animaux de l'étude feront l'objet d'une autopsie complète et détaillée, comportant l'examen attentif de la surface externe du corps, de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Le foie et la vésicule biliaire, les reins, les glandes surrénales, les testicules, les épididymes, les ovaires, l'utérus, la thyroïde (et les glandes parathyroïdes) le thymus, la rate, le cerveau et le cœur de tous les animaux (à l'exception des animaux moribonds et/ou sacrifiés avant la fin de l'essai) doivent être disséqués et pesés à l'état frais dès que possible afin d'éviter leur dessiccation.

▼B

Les tissus suivants doivent être conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu: tous les organes présentant des lésions macroscopiques l'encéphale (les régions représentatives du cerveau, du cervelet, de la moelle et du pont), la moelle épinière (à trois niveaux: cervical, médiothoracique et lombaire), l'hypophyse, les yeux, la thyroïde, les glandes parathyroïdes, le thymus, l'œsophage, les glandes salivaires, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin (y compris les plaques de Peyer), le foie, la vésicule biliaire, le pancréas, les reins, les glandes surrénales, la rate, le cœur, la trachée et les poumons, l'aorte, les gonades, l'utérus, les organes génitaux auxiliaires, les glandes mammaires des femelles, la prostate, la vessie, les ganglions lymphatiques (de préférence un ganglion lymphatique faisant partie du territoire de drainage dont dépend la voie d'administration et un autre faisant partie d'un autre territoire de drainage afin de détecter les éventuels effets systémiques), les nerfs périphériques (sciatiques ou tibiaux), de préférence proches du muscle, un prélèvement de moelle osseuse (et/ou une ponction de moelle osseuse examinée directement) et la peau. Les observations cliniques et les observations macroscopiques peuvent conduire à l'examen de tissus supplémentaires. Tous les organes considérés comme des organes cibles vraisemblables de la substance d'essai, compte tenu de ses propriétés, devraient également être conservés.

1.5.5.4. *Histopathologie*

Un examen histopathologique complet doit être pratiqué sur les tissus et organes conservés de tous les animaux appartenant au moins au groupe témoin et au groupe traité à la dose la plus élevée. Si des changements liés au traitement sont constatés dans le groupe traité à la dose la plus élevée, il faudra étendre cet examen aux animaux de tous les groupes traités.

Toutes les lésions macroscopiques doivent être examinées.

Si un groupe satellite est inclus, les tissus et organes sur lesquels des effets ont été observés dans les groupes traités doivent faire l'objet d'un examen histopathologique.

2. RÉSULTATS ET RAPPORT

2.1. RÉSULTATS

Les résultats correspondant à chaque animal doivent être fournis. En outre, tous les résultats doivent être résumés sous forme de tableaux faisant apparaître pour chaque groupe d'essai, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, le moment de la mort ou du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des symptômes de toxicité et une description des signes de toxicité observés, notamment le moment de leur apparition, leur durée et leur gravité, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions et le pourcentage d'animaux affectés par chaque type de lésion.

S'il y a lieu, les résultats numériques devraient être évalues par une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Le choix des méthodes statistiques et des résultats à analyser devrait intervenir au stade de la rédaction du protocole d'étude.

2.2. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

▼B

2.2.1. **Substance d'essai**

— État physique, pureté et propriétés physico-chimiques,

— données permettant l'identification chimique,

— véhicule (le cas échéant), justification du choix si autre que l'eau.

2.2.2. **Animaux d'expérience**

— Espèce et souche utilisée,

— nombre, âge et sexe des animaux,

— source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,

— poids de chaque animal au début de l'essai.

2.2.3. **Conditions d'essai**

— Justification du choix des doses,

— détails concernant la préparation contenant la substance d'essai, son incorporation dans la nourriture, la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation.

— détails relatifs à l'administration de la substance d'essai,

— doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et facteur de conversion de la concentration de la substance d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson (en ppm) en dose réelle, s'il y a lieu,

— détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau.

2.2.4. **Résultats**

— Poids corporel et variation de poids corporel,

— consommation de nourriture et d'eau, le cas échéant,

— données sur la réponse toxique par sexe et par dose et description des signes de toxicité,

— nature, gravité et durée des observations cliniques (réversibles ou non),

— résultats de l'examen ophtalmologique,

— paramètres hématologiques et valeurs normales de référence,

— paramètres de biochimie clinique et valeurs normales de référence,

— poids du corps et des organes des animaux à leur mort et rapports poids de l'organe/poids corporel,

— résultats d'autopsie,

— description détaillée de tous les résultats histopathologiques,

— données relatives à l'absorption, le cas échéant,

— traitement statistique des résultats, s'il y a lieu.

Discussion des résultats.

Conclusions.

▼B

B.28. **TOXICITÉ DERMIQUE SUBCHRONIQUE ÉPREUVE DE 90 JOURS SUR DES RONGEURS**

1. **MÉTHODE**

1.1 INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Voir introduction générale, partie B.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Néant.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Les doses croissantes de la substance d'essai sont appliquées quotidiennement, sur la peau des animaux de plusieurs lots d'expérience, à raison d'une dose par lot durant une période de 90 jours. Durant la période d'application, les animaux sont observés quotidiennement afin de déceler les manifestations de toxicité. Les animaux qui meurent en cours d'expérience de même que ceux encore en vie à l'issue de celle-ci sont autopsiés.

1.5. CRITÈRE QUALITATIF

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.6.1. **Préparations**

Les animaux sont maintenus dans les conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience pendant au moins les 5 jours qui la précèdent. Avant de commencer l'essai, les jeunes animaux sains sont répartis au hasard en lots traités et lots témoins. Peu de temps avant l'essai, on tond la fourrure de la région dorsale des animaux. On peut avoir recours au rasage, mais l'opération doit alors être effectuée 24 heures environ avant l'essai. Il est habituellement nécessaire de répéter ces opérations toutes les semaines environ et il faut prendre grand soin d'éviter toute lésion de la peau pendant ces opérations. La surface à dégager pour l'application de la substance à tester ne sera pas inférieure à 10 % de la surface corporelle. Le poids de l'animal sera pris en compte pour décider de la zone à dégager et des dimensions de la surface à traiter. Lorsque l'essai porte sur des substances solides qui, le cas échéant, peuvent être pulvérisées, la substance à tester doit être humectée au moyen d'eau ou, au besoin, d'un véhicule approprié de manière à garantir un bon contact avec la peau. Les substances liquides sont généralement testées sans dilution préalable. On procède à une application quotidienne à raison de 5 à 7 jours par semaine.

1.6.2. *Conditions expérimentales*

1.6.2.1. Animaux d'expérience

Le rat, le lapin ou le cochon d'Inde adultes peuvent être utilisés; d'autres espèces aussi, mais il faut alors en justifier l'emploi. Au commencement de l'expérience, la différence de poids entre les animaux ne dépassera pas ± 20 % de la valeur moyenne. Si une étude dermique subchronique constitue la phase préparatoire d'une étude à long terme, la même espèce et la même souche seront utilisées pour les deux études.

▼B

1.6.2.2. Nombre et sexe

20 animaux au moins (10 femelles et 10 mâles) à la peau saine seront utilisés pour chaque niveau de dose. Les femelles seront nullipares et non gravides. Si l'on prévoit de sacrifier certains animaux en cours d'expérience, il y a lieu d'ajouter à ce nombre celui des animaux qu'il est prévu de sacrifier avant la fin de l'expérience. De plus, un groupe satellite de 20 animaux (10 par sexe) peut être traité avec la dose la plus élevée pendant 90 jours et faire l'objet d'une observation quant à la réversibilité, la persistance ou l'apparition tardive des effets toxiques durant les 28 jours qui suivent le traitement.

1.6.2.3. Doses

On utilisera au moins trois doses ainsi qu'un lot témoin ou, le cas échéant, un lot témoin pour le véhicule. La période d'exposition sera d'au moins six heures par jour. La substance à tester sera appliquée chaque jour à la même heure et sa quantité fera l'objet d'un ajustement hebdomadaire ou bi-hebdomadaire afin de conserver une dose constante en rapport avec le poids corporel de l'animal. À l'exception de l'application de la substance à tester, les animaux du lot témoin seront traités de la même façon que les sujets des lots traités. Si un véhicule est utilisé pour faciliter l'application, il sera administré au lot témoin dans les mêmes conditions que pour les lots traités et la dose reçue correspondra à celle du lot traité par la dose la plus élevée. La dose la plus élevée doit être déterminée de manière à produire des effets toxiques mais pas, ou rarement, la mort de l'animal; la dose la plus faible ne doit faire apparaître aucun effet toxique. Si l'on dispose d'informations sur le niveau de l'exposition humaine, la dose la plus faible dépassera cette valeur. L'idéal serait que la dose intermédiaire produise l'effet toxique minimal observable. Si l'on utilise plusieurs doses intermédiaires, l'écart entre les doses sera calculé de manière à entraîner une gradation des effets toxiques. Dans les lots correspondant aux doses faible et intermédiaire ainsi que chez les témoins, le nombre de décès sera faible, afin de permettre une évaluation significative des résultats.

Si l'application de la substance à tester provoque une grave irritation cutanée, les concentrations seront réduites; ceci peut entraîner une diminution, voire une disparition, des autres effets toxiques à la dose la plus élevée. Si les lésions cutanées sont très graves, il peut s'avérer nécessaire d'arrêter l'expérience et de la recommencer avec des concentrations plus faibles.

1.6.3. **Essai de limite**

Si une expérience préliminaire réalisée avec une dose de 1 000 mg/kg ou avec une dose plus élevée en fonction de la possibilité d'une exposition humaine — pour autant que celle-ci soit connue — n'a provoqué aucun effet toxique, on peut juger inutile de poursuivre l'expérience.

1.6.4. **Période d'observation**

Les animaux d'expérience feront l'objet d'observations quotidiennes afin de déceler les manifestations de toxicité. Le moment de la mort ainsi que le moment auquel les manifestations de toxicité apparaissent et disparaissent seront notés.

▼B

1.6.5. **Mode opératoire**

Les animaux seront placés dans des cages individuelles. Dans les conditions idéales, la substance d'essai est administrée aux animaux 7 jours sur 7 pendant une période de 90 jours.

Les animaux de tous les groupes satellites devant faire l'objet d'observations complémentaires seront gardés en vie pendant 28 jours encore, sans traitement, afin de constater la guérison ou la persistance des effets toxiques. La durée d'exposition sera de 6 heures par jour.

La substance d'essai sera appliquée uniformément sur une surface à peu près égale à 10 % de la surface totale du corps. Dans le cas de substances hautement toxiques, la surface couverte peut être moins importante mais la couche doit être aussi mince et aussi uniforme que possible.

Durant l'exposition, la substance d'essai est maintenue en contact avec la peau au moyen d'un carré de gaze poreux et d'un sparadrap non irritant. La surface traitée sera, en outre, convenablement couverte de manière à maintenir en place le pansement de gaze et la substance d'essai et à éviter que les animaux puissent ingérer ladite substance. Des appareils de contention peuvent être utilisés pour empêcher l'ingestion de la substance mais une immobilisation complète n'est pas recommandée.

À l'issue de la période d'exposition, il faut, si possible, éliminer tout résidu de substance avec de l'eau ou par tout autre procédé adéquat de nettoyage de la peau.

Tous les animaux seront observés quotidiennement et les manifestations de toxicité ainsi que le moment de leur apparition, leur intensité et leur durée seront enregistrés. Pendant la période d'encagement, on observera notamment les modifications du poil et de la peau, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux autonome et central ainsi que de l'activité somatomotrice et du comportement. La consommation alimentaire et le poids des animaux seront déterminés chaque semaine. Il est nécessaire d'observer régulièrement les animaux afin d'éviter toute perte par cannibalisme, autolyse des tissus ou erreur de mise en place. À l'issue de l'expérience, tous les animaux survivants des lots traités non satellites seront autopsiés. Les animaux moribonds seront immédiatement retirés et autopsiés.

Les examens ci-après sont habituellement effectués pour tous les animaux, y compris ceux du lot témoin:

a) Un examen ophtalmologique sera pratiqué à l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un appareil équivalent avant d'administrer la substance à tester ainsi qu'au terme de l'expérience, de préférence pour tous les animaux mais au moins pour le lot traité par la dose la plus élevée ainsi que pour le lot témoin. Si des modifications oculaires sont observées tous les animaux seront examinés.

b) Un examen hématologique comprenant l'hématocrite, la concentration en hémoglobine, la numération des hématies et des leucocytes, la formule leucocytaire ainsi qu'une étude de la coagulation par des épreuves telles que temps de coagulation, temps de Quick, temps de thromboplastine ou numération des plaquettes sanguines sera effectué au terme de l'expérience.

▼B

c) Des déterminations biochimiques cliniques dans le sang seront effectuées à l'issue de l'expérience. L'équilibre électrolytique, le métabolisme glucidique, les fonctions hépatique et rénale présentent un intérêt général pour toutes les études. Le choix d'épreuves spécifiques sera influencé par les observations relatives au mode d'action de la substance. Il est suggéré de doser les substances suivantes: le calcium, le phosphore, les chlorures, le sodium, le potassium, le glucose à jeun (la période de jeûne étant adaptée à l'espèce), les transaminases glutamo-pyruvique ([1]) et glutamo-oxaloacétique ([2]), l'ornithine-décarboxylase, la gamma-glutamyl transpeptidase, l'azote uréique, l'albumine, la créatinine plasmatique, la bilirubine totale et les protéines sériques totales. Les autres analyses éventuellement nécessaires à une évaluation toxicologique adéquate concernent les lipides, les hormones, l'équilibre acido-basique, la méthémoglobine, l'activité cholinestérasique. D'autres analyses biochimiques cliniques peuvent, si nécessaire, être effectuées pour approfondir l'étude des effets observés.

d) Un examen régulier des urines n'est pas nécessaire; un tel examen n'est indiqué qu'en cas de toxicité probable ou manifeste.

Si les informations recueillies dans le passé ne sont pas appropriées, les paramètres hématologiques et biochimiques cliniques seront déterminés avant le commencement de l'expérience.

1.6.6. **Autopsie**

Tous les animaux seront soumis à une autopsie complète comprenant l'examen de la surface externe du corps, de tous les orifices, ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Le foie, les reins, les glandes surrénales et les testicules seront pesés, à l'état humide, le plus rapidement possible après la dissection afin d'éviter le dessèchement. Les organes et tissus ci-après seront conservés dans un milieu approprié dans l'éventualité d'examens histopathologiques ultérieurs: toute lésion macroscopique, encéphale — y compris section de la moelle/du pont de Varole, cortex cérébelleux et cortex cérébral, hypophyse, thyroïde/parathyroïde, tout tissu thymique, (trachée), poumons, cœur, aorte, glandes salivaires, foie, rate, reins, glandes surrénales, pancréas, gonades, organes génitaux annexes, vésicule biliaire (si présente), œsophage, estomac, duodénum, jéjunum, iléon, cæcum, colon, rectum, vessie urinaire, ganglion lymphatique représentatif, (femelle: glande mammaire), (musculature de la cuisse), nerf périphérique, (yeux), (sternum avec moelle osseuse), (fémur — y compris surface articulaire), (moelle épinière à trois niveaux — cervical, médiothoracique et lombaire) et (glandes lacrymales). Les tissus mentionnés entre parenthèses ne seront examinés que sur indication des signes de toxicité ou en cas d'atteinte de l'organe.

1.6.7. **Examen histopathologique**

a) La peau normale et la peau traitée ainsi que les organes et tissus de tous les animaux du lot témoin et du lot exposé à la dose la plus élevée doivent faire l'objet d'un examen histopathologique complet.

b) Toutes les lésions macroscopiques seront examinées.

([1]) Connue actuellement sous le nom d'alanine transaminase serique.
([2]) Connue actuellement sous le nom d'aspartate transaminase sérique.

▼B

c) Les organes-cibles des animaux appartenant aux autres lots traités seront examinés.

d) Si l'on utilise des rats, les poumons des animaux appartenant aux lots exposés aux doses faible et intermédiaire seront soumis à un examen histopathologique afin de déceler tout signe d'infection qui permette de juger facilement de l'état de santé des animaux. D'autres examens histopathologiques systématiques peuvent ne pas être nécessaires pour les animaux de ces lots mais doivent toujours être effectués pour les organes présentant des lésions dans le groupe traité par la dose la plus élevée.

e) Lorsqu'un lot satellite est utilisé, un examen histopathologique sera pratiqué sur les tissus et organes présentant des signes de toxicité dans les lots traités.

2. **RÉSULTATS**

Les résultats seront résumés sous la forme de tableaux indiquant, pour chaque expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux atteints de lésions, le type de lésions et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion. Les résultats seront évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique reconnue peut être utilisée.

3. **RAPPORT**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

— espèce, souche, origine, milieu ambiant, régime alimentaire, etc.,

— conditions expérimentales,

— doses (y compris, le cas échéant, véhicule) et concentrations,

— dose dépourvue d'effet, si possible,

— réponse toxique par sexe et par dose,

— moment de la mort en cours d'expérience ou indication que l'animal était encore en vie au terme de l'expérience,

— description des effets toxiques ou autres,

— moment de l'observation de tout symptôme et évolution de celui-ci,

— quantité de nourriture et poids corporel,

— observations ophtalmologiques,

— examens hématologiques pratiqués et résultats,

— épreuves biochimiques cliniques pratiquées et résultats (y compris, résultats de l'examen des urines),

— résultats d'autopsie,

▼B

— description détaillée de toutes les observations histopathologiques,

— traitement statistique des résultats, si possible,

— discussion des résultats,

— interprétation des résultats.

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

▼M4

B.29. TOXICITÉ SUBCHRONIQUE PAR INHALATION: ÉTUDE SUR 90 JOURS

RÉSUMÉ

La présente méthode d'essai B.29 révisée a été conçue afin de caractériser pleinement la toxicité par inhalation d'une substance d'essai à la suite d'une exposition subchronique (90 jours), et de fournir des données fiables en vue d'estimations quantitatives des risques liés à l'inhalation. Des groupes de rongeurs (10 mâles et 10 femelles) sont exposés 6 heures par jour pendant une période de 90 jours (13 semaines) a) à la substance d'essai à trois niveaux de concentration ou plus, b) à de l'air filtré (témoin négatif), et/ou c) au véhicule (groupe témoin du véhicule). Les animaux sont exposés en général 5 jours par semaine, mais il est aussi permis de les exposer 7 jours par semaine. Des mâles et des femelles sont toujours utilisés, mais peuvent être exposés à des niveaux de concentration différents si l'un des sexes est connu pour être plus sensible à une substance d'essai donnée. Afin de mieux caractériser la toxicité de la substance d'essai, la présente méthode laisse la possibilité au directeur de l'étude d'inclure des groupes satellites (étude de réversibilité), des sacrifices en cours d'essai, des lavages broncho-alvéolaires (LBA), des tests neurologiques et des évaluations histopathologiques ou de pathologie clinique supplémentaires.

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 413 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (2009). Le texte original de la ligne directrice 413 sur la toxicité subchronique par inhalation avait été adopté en 1981 (1). La présente méthode d'essai B.29 [équivalente à la ligne directrice 413 révisée (2009)] a été mise à jour pour prendre en compte l'état de la science et répondre aux exigences règlementaires actuelles et futures.

2. Les études de toxicité subchronique par inhalation sont principalement utilisées pour calculer des concentrations réglementaires en vue d'évaluer les risques pour les travailleurs en milieu professionnel. Elles servent aussi à estimer les risques liés à l'exposition humaine dans les lieux d'habitation, les transports et l'environnement. La présente méthode d'essai permet de caractériser les effets nocifs résultant d'une exposition quotidienne répétée, par inhalation, à une substance d'essai pendant 90 jours (approximativement 10 % de la durée de vie d'un rat). Les données dérivées des études de toxicité subchronique par inhalation peuvent être utilisées pour procéder à des estimations quantitatives des risques et pour choisir les concentrations dans les études de toxicité chronique. La présente méthode d'essai n'est pas spécifiquement destinée à tester les nanomatériaux. Le document d'orientation n° 39 regroupe les définitions utilisées dans le contexte de cette méthode d'essai (2).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

3. Avant toute étude, le laboratoire d'essai devra prendre en compte toutes les informations disponibles sur la substance à tester afin d'améliorer la qualité de l'étude et de recourir le moins possible aux animaux. Parmi les informations utiles pour la détermination des concentrations d'essai appropriées, citons: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les résultats de tous les essais de toxicité in vitro ou in vivo auxquels elle a été soumise; son (ses) utilisation(s) escomptée(s) et les risques d'exposition humaine; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques sur les substances structurellement apparentées; ainsi que les données issues d'autres études sur l'exposition répétée. En cas de neurotoxicité, connue ou observée au cours de l'étude, le directeur de l'étude pourra décider d'inclure les évaluations jugées nécessaires, comme une batterie d'observations fonctionnelles (FOB) et des mesures de l'activité motrice. Bien que la durée des expositions par rapport à des examens spécifiques puisse être critique, l'exécution de ces activités supplémentaires n'interfère pas avec la conception de l'étude principale.

▼M4

4. Les dilutions de substances corrosives ou irritantes peuvent être testées à des concentrations qui permettront d'atteindre le degré de toxicité désiré. Le document d'orientation n° 39 (2) fournit de plus amples informations. Lors de l'exposition des animaux à ces substances, les concentrations cibles sont assez faibles pour ne causer ni souffrance manifeste ni détresse, mais suffisantes pour prolonger la courbe concentration-réponse jusqu'à des niveaux correspondant à l'objectif scientifique et règlementaire de l'essai. Le choix de ces concentrations est fait au cas par cas, de préférence sur la base d'une étude préliminaire de détermination des concentrations, conçue de façon appropriée, et qui fournit des informations sur l'effet critique mesuré, un éventuel seuil d'irritation et le moment de son apparition (voir paragraphes 11-13). La justification du choix des concentrations est fournie.

5. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés. Les animaux moribonds sont pris en compte au même titre que ceux qui succombent au cours de l'essai. Le document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (3) détaille les critères orientant la décision d'euthanasier les animaux moribonds ou en grande souffrance, et aide à reconnaître une mort prévisible ou imminente.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Sélection des espèces animales

6. Le choix s'orientera vers de jeunes rongeurs adultes en bonne santé, de souches communément utilisées en laboratoire. Le rat étant l'espèce la plus utilisée, il faudra justifier l'emploi d'autres espèces.

Préparation des animaux

7. Les femelles sont nullipares et non gravides. Le jour de la randomisation, les animaux sélectionnés sont de jeunes adultes âgés de 7 à 9 semaines. Leur poids corporel n'excède pas ± 20 % du poids moyen pour chaque sexe. Sélectionnés au hasard, les animaux sont marqués pour être identifiés individuellement. En vue de leur acclimatation aux conditions de laboratoire, ils sont conservés dans leur cage pour une période d'au minimum 5 jours avant le début de l'essai.

Conditions d'élevage des animaux

8. Les animaux sont identifiés de façon individuelle, de préférence à l'aide de dispositifs sous-cutanés, afin de faciliter leur observation et d'éviter toute confusion. La température du local expérimental où les animaux sont conservés est maintenue à 22 ± 3 °C. Le taux d'humidité relative est idéalement maintenu entre 30 et 70 %, encore qu'il ne soit pas toujours possible de le faire si l'eau est utilisée comme véhicule. Avant et après exposition, les animaux sont généralement être mis en cage en groupes par sexe et par concentration, mais le nombre d'animaux par cage ne fait pas obstacle à une observation précise de chaque animal, et n'engendre qu'un minimum de pertes dues au cannibalisme et aux combats. Si les animaux sont exposés «nez seul», il peut être nécessaire de les acclimater aux tubes de contention. Ceux-ci ne doivent pas provoquer chez les animaux de stress excessif, qu'il soit de nature physique, thermique ou dû à leur immobilisation. Les contraintes qu'ils subissent peuvent en effet modifier les paramètres physiologiques mesurés de l'animal, comme sa température corporelle (hyperthermie) et/ou son volume respiratoire par minute. Si l'on dispose de données génériques montrant que de telles modifications ne se produisent pas de façon appréciable, alors la période d'adaptation préalable aux tubes de contention n'est pas nécessaire. Les animaux exposés «corps entier» à un aérosol sont enfermés individuellement pendant l'exposition pour empêcher la filtration de l'aérosol d'essai par à la fourrure des congénères. À l'exception des périodes d'exposition, le régime alimentaire des animaux est le régime classique et certifié de laboratoire, avec eau potable à satiété. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité.

▼M4

Chambre d'inhalation

9. Le choix de la chambre d'inhalation prend en compte la nature de la substance d'essai et l'objet de l'essai. Le mode d'exposition «nez seul» (qui inclut les dispositifs «tête seule», «nez seul» et «museau seul») est privilégié. Le mode d'exposition «nez seul» est généralement choisi pour les études d'aérosols liquides ou solides et pour les vapeurs susceptibles de se condenser en aérosols. L'utilisation d'un mode d'exposition «corps entier» peut être préférable pour les besoins spécifiques de l'étude, mais cela est justifié dans le rapport de l'étude. Pour assurer la stabilité de l'atmosphère d'une chambre d'exposition «corps entier», on veillera à ce que le «volume» total des animaux d'expérience ne dépasse pas 5 % du volume de la chambre. Le document d'orientation 39 (2) décrit les principes des techniques d'exposition «corps entier» ou «nez seul», ainsi que leurs avantages et inconvénients spécifiques.

ÉTUDES DE TOXICITÉ

Concentrations limites

10. Contrairement aux études de toxicité aiguë, aucune concentration limite n'est définie dans les études de toxicité subchronique par inhalation. La concentration maximale testée prend en compte: 1) la concentration maximale pouvant être atteinte, 2) le niveau d'exposition humaine correspondant au «pire des cas», 3) la nécessité de maintenir une alimentation adéquate en oxygène, et/ou 4) le bien- être des animaux. En l'absence de limites fondées sur des données, les valeurs limites pour la toxicité aiguë du règlement (CE) n° 1272/2008 (13) peuvent être utilisées (c'est-à-dire jusqu'à une concentration maximale de 5 mg/l pour les aérosols, 20 mg/l pour les vapeurs et 20 000 ppm pour les gaz); voir document d'orientation 39 (2). S'il est nécessaire de dépasser ces limites lors d'essais de gaz ou de substances d'essai hautement volatils (comme les réfrigérants), une justification est produite. La concentration limite doit permettre d'obtenir une toxicité sans équivoque, sans causer de stress excessif chez les animaux ni affecter leur longévité (3).

Étude préliminaire de détermination des concentrations

11. Avant le début de l'étude principale, une étude préliminaire de détermination des concentrations est généralement nécessaire. Plus complète qu'une étude d'observation, elle n'est pas limitée par le choix des concentrations. Les connaissances acquises grâce à une étude préliminaire de détermination des concentrations peuvent conduire à la réussite de l'étude principale. En effet, une telle étude peut fournir des informations techniques sur les méthodes d'analyse, la taille des particules, la découverte de mécanismes de toxicité, les données histopathologiques et de pathologie clinique, et les estimations de la concentration sans effet nocif observé (CSENO) et de la concentration maximale acceptable (CMA) dans une étude principale. Le directeur d'étude peut décider de s'appuyer sur une étude préliminaire de détermination des concentrations pour identifier: le seuil d'irritation de l'appareil respiratoire (par exemple avec une histopathologie de l'appareil respiratoire, des tests de la fonction pulmonaire ou des lavages bronchoalvéolaires), la concentration la plus élevée tolérée par les animaux sans provoquer de stress excessif, et les paramètres qui permettront de caractériser au mieux la toxicité de la substance d'essai.

12. Une étude préliminaire de détermination des concentrations peut comporter un ou plusieurs niveaux de concentration. Selon les effets à mesurer retenus, trois à six mâles et trois à six femelles sont exposés à chaque niveau de concentration. La durée d'une étude préliminaire de détermination des concentrations est d'au minimum 5 jours et ne pas excéder 28 jours en général. Il convient d'exposer dans le rapport d'étude les raisons du choix des concentrations retenues pour l'étude principale, dont l'objet est de démontrer une relation concentration-réponse basée sur l'effet mesuré le plus sensible auquel on s'attend. La concentration la plus faible n'engendre en principe aucune manifestation de toxicité, tandis que la concentration la plus élevée permet d'obtenir une toxicité sans équivoque, sans causer de stress excessif chez les animaux ni affecter leur longévité (3).

▼M4

13. Lors du choix des niveaux de concentration pour l'étude préliminaire de détermination des concentrations, toutes les informations disponibles sont prises en compte, y compris les relations structure-activité et les données correspondant à des produits chimiques analogues (voir paragraphe 3). Une étude préliminaire de détermination des concentrations peut confirmer ou réfuter le choix des effets mesurés les plus sensibles selon des critères mécanistiques, comme l'inhibition de la cholinestérase par des composés organophosphorés, la formation de méthémoglobine par des agents cytotoxiques d'isomérie érythro, les hormones thyroïdiennes (T_3, T_4) dans le cas de thyrotoxiques, les protéines, la LDH, ou les neutrophiles dans les lavages bronchoalvéolaires dans le cas de particules inoffensives faiblement solubles ou d'aérosols irritants pour les poumons.

Étude principale

14. L'étude principale de toxicité subchronique comporte en général trois niveaux de concentration ainsi qu'un témoin négatif (air) et/ou un témoin du véhicule, s'il y a lieu (voir paragraphe 18). L'ensemble des informations disponibles doit permettre de déterminer les niveaux d'exposition appropriés, y compris les résultats des études systémiques de toxicité, le métabolisme et la cinétique (on prendra garde d'éviter les niveaux de concentration élevée avec des processus cinétiques de saturation). Chaque groupe d'essai comprend au moins 10 rongeurs mâles et 10 rongeurs femelles exposés à la substance d'essai 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 13 semaines (soit une durée totale de l'étude d'au moins 90 jours). Les animaux peuvent aussi être exposés 7 jours par semaine (par exemple dans le cas d'essais sur des produits pharmaceutiques inhalés). S'il est connu qu'un des sexes est plus réactif à la substance d'essai, les niveaux de concentration peuvent différer selon le sexe afin d'optimiser la concentration-réponse telle que décrite au paragraphe 15. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées «nez seul», il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Lorsque la durée d'exposition est inférieure à 6 heures par jour ou qu'il est nécessaire de mener une étude d'exposition «corps entier» de longue durée (par exemple de 22 heures par jour), des justifications sont fournies, voir document d'orientation 39 (2). Les animaux sont privés de nourriture pendant l'exposition sauf si sa durée dépasse 6 heures. Dans une exposition «corps entier», les animaux peuvent boire de l'eau.

15. Les concentrations cibles choisies permettent d'identifier le(s) organe(s) cible(s) et de mettre en évidence une concentration-réponse claire:

— le niveau de concentration élevé produit des effets toxiques sans engendrer de signes persistants ou la mort, ce qui empêcherait une évaluation valable des résultats,

— le(s) niveau(x) de concentration intermédiaire(s) est (sont) espacé(s) de manière à produire une gradation dans les effets toxiques observés avec une concentration faible et avec une concentration élevée,

— le niveau de concentration faible ne produit quasiment aucune manifestation de toxicité.

Sacrifices en cours d'essai

16. Si l'on envisage le sacrifice d'animaux en cours d'essai, il faut accroître le nombre d'animaux exposés à chaque niveau de concentration du nombre prévu d'animaux sacrifiés avant la fin de l'épreuve. Le recours aux sacrifices en cours d'essai est justifié, et les analyses statistiques en tiennent dûment compte.

▼M4

Étude satellite (étude de réversibilité)

17. Une étude de réversibilité peut être utilisée pour mettre en évidence le caractère réversible, persistant ou retardé de la toxicité, pour une période post-traitement d'une durée appropriée d'au minimum 14 jours. Les groupes satellites sont constitués de dix mâles et de dix femelles exposés en même temps que les animaux d'expérience de l'étude principale. Ils sont exposés à la concentration la plus élevée de la substance d'essai. Il convient également de faire appel à un témoin parallèle (air) et, le cas échéant, à un témoin du véhicule (voir paragraphe 18).

Animaux témoins

18. Les animaux du groupe témoin négatif (air) sont traités d'une manière identique à ceux du groupe d'animaux d'essai, mais au lieu de la substance d'essai, ils sont exposés à de l'air filtré. Lorsque de l'eau ou une autre substance est utilisée pour produire l'atmosphère d'essai, un groupe témoin du véhicule est inclus dans l'étude, à la place du groupe témoin négatif exposé à l'air seulement. Autant que possible, l'eau est le véhicule utilisé. Dans ce cas, les animaux témoins sont exposés à un air dont le taux d'humidité relative est le même que pour les groupes exposés à la substance d'essai. Le choix du véhicule s'opère sur la base d'une étude préliminaire appropriée ou de données historiques. Si la toxicité d'un véhicule est mal connue, le directeur de l'étude peut choisir d'utiliser un témoin négatif (air) et un témoin du véhicule, mais cela est toutefois fortement déconseillé. Si les données historiques montrent qu'un véhicule n'est pas toxique, le groupe témoin à l'air n'est pas nécessaire et seul un témoin du véhicule est utilisé. Si aucune toxicité n'a été détectée lors de l'étude préliminaire d'une substance d'essai préparée dans un véhicule, ce véhicule est considéré comme non toxique à la concentration testée et est utilisé comme véhicule témoin.

CONDITIONS D'EXPOSITION

Administration des concentrations

19. Les animaux sont exposés à la substance d'essai présentée sous forme de gaz, de vapeur, d'aérosol ou sous une forme mixte. L'état physique à tester dépend des propriétés physico-chimiques de la substance, des concentrations choisies, et/ou de la forme physique sous laquelle il est le plus probable qu'elle se présente lors de sa manipulation et de son utilisation. Les substances d'essai chimiquement réactives ou hygroscopiques sont testées sous air sec. On prendra soin d'éviter les concentrations susceptibles de provoquer une explosion. Les matières particulaires peuvent être soumises à des procédés mécaniques afin de réduire la taille des particules. Pour plus d'informations, se reporter au document d'orientation 39 (2).

Répartition granulométrique

20. Une mesure de la taille des particules est réalisée pour tous les aérosols et les vapeurs susceptibles se condenser pour former des aérosols. Pour que toutes les régions pertinentes de l'appareil respiratoire soient exposées, il est recommandé d'utiliser des aérosols dont le diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) se situe entre 1 et 3 μm, avec un écart type géométrique (σg) compris entre 1,5 et 3,0 (4). Un effort raisonnable est fourni pour remplir ces conditions, mais si tel n'est pas le cas, un jugement d'expert est nécessaire. Par exemple, les particules des fumées métalliques auront une taille inférieure à cette norme, et les particules chargées ou les fibres peuvent avoir une taille supérieure.

▼M4

Préparation de la substance d'essai dans un véhicule

21. La substance d'essai est idéalement testée sans véhicule. S'il est nécessaire d'avoir recours à un véhicule pour atteindre la concentration et la taille particulaire voulues de la substance d'essai, l'eau est choisie de préférence. Chaque fois qu'une substance d'essai est dissoute dans un véhicule, sa stabilité est démontrée.

CONTRÔLE DES CONDITIONS D'EXPOSITION

Débit d'air dans la chambre d'exposition

22. Le débit d'air dans la chambre d'exposition est contrôlé avec soin, surveillé en continu et enregistré au moins toutes les heures pendant chaque exposition. Le suivi en temps réel de la concentration de l'atmosphère d'essai (ou stabilité temporelle) constitue une mesure complète de tous les paramètres dynamiques et fournit un moyen indirect de contrôler tous les paramètres d'inhalation dynamiques pertinents. Si la concentration est suivie en temps réel, la fréquence peut être ramenée à une seule mesure du débit de l'air par exposition et par jour. On prendra particulièrement soin d'éviter toute re-respiration dans les chambres d'exposition «nez seul». La concentration d'oxygène est d'au moins 19 % et celle de dioxyde de carbone ne dépasse pas 1 %. Si ces conditions ne peuvent être respectées, les concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone sont mesurées. Si les mesures du premier jour d'exposition montrent que la concentration de ces gaz est appropriée, aucune mesure complémentaire ne devrait être nécessaire.

Température et humidité relative de la chambre d'exposition

23. La température de la chambre d'exposition est maintenue à 22 ± 3 °C. Dans les cas d'exposition «nez seul» et «corps entier», l'humidité relative dans la zone où respire l'animal est autant que possible surveillée en continu et enregistrée toutes les heures pendant chaque exposition. L'humidité relative est de préférence comprise entre 30 et 70 %. Il est possible que ce taux ne puisse être atteint (par exemple lorsque la substance d'essai se présente sous forme de solution aqueuse), ou qu'il ne puisse être mesuré en raison d'interférences de la substance avec la méthode d'essai.

Substance d'essai: concentration nominale

24. Dans la mesure du possible, la concentration nominale dans la chambre d'exposition est calculée et enregistrée. La concentration nominale est la masse de la substance d'essai divisée par le volume d'air total qui passe dans le circuit de la chambre d'inhalation. La concentration nominale ne sert pas à caractériser l'exposition des animaux, mais une comparaison de la concentration nominale avec la concentration réelle donne une indication de la capacité de production du système d'essai, et peut donc permettre de mettre en évidence des problèmes de production.

Substance d'essai: concentration réelle

25. La concentration réelle est la concentration de la substance d'essai prélevée dans la zone de la chambre d'inhalation où les animaux respirent. Les concentrations réelles peuvent être obtenues par des méthodes spécifiques (par exemple, échantillonnage direct, méthodes d'adsorption ou de réaction chimique, et caractérisation analytique ultérieure) ou par des méthodes non spécifiques comme la gravimétrie sur filtre. Le recours à l'analyse gravimétrique n'est acceptable que pour des aérosols ne contenant qu'un seul composant en poudre ou pour des aérosols de liquides peu volatils, et des caractérisations spécifiques à la substance d'essai sont également effectuées par une pré-étude appropriée. Il est aussi possible d'avoir recours à la gravimétrie pour déterminer la concentration d'un aérosol contenant

▼M4

plusieurs composants en poudre, mais des données analytiques sont alors nécessaires, afin de démontrer que la composition du produit en suspension dans l'air est analogue à celle du produit de départ. Faute de cette information, il peut s'avérer nécessaire de soumettre le produit à tester (idéalement en suspension dans l'air) à une nouvelle analyse à intervalles réguliers tout au long de l'étude. Pour des agents aérosolisés susceptibles de s'évaporer ou de se sublimer, il faut démontrer que toutes les phases ont été recueillies selon la méthode choisie.

26. Pendant toute la durée de l'étude, il est recommandé de n'employer si possible qu'un seul lot de la substance d'essai, et l'échantillon de la substance est conservé dans des conditions préservant sa pureté, son homogénéité et sa stabilité. Avant le début de l'étude, il convient de réaliser une caractérisation de la substance d'essai afin de déterminer sa pureté et, si cela est techniquement possible, son identité et les quantités de contaminants et d'impuretés identifiés. Pour cela, on pourra recueillir les données suivantes: temps de rétention et surface relative du pic, poids moléculaire obtenu par spectroscopie de masse ou chromatographie en phase gazeuse, ou autres estimations. Bien que le laboratoire d'essai ne soit pas responsable de l'identification de la substance d'essai, il peut, par prudence, confirmer au moins une partie des caractéristiques fournies par le donneur d'ordre (couleur, nature physique, etc.).

27. L'atmosphère d'exposition est maintenue constante autant que possible. Un dispositif de suivi en temps réel, tel qu'un photomètre à aérosol pour les aérosols ou un analyseur d'hydrocarbures totaux pour les vapeurs, peut être utilisé pour démontrer la stabilité des conditions d'exposition. La concentration réelle dans la chambre est mesurée au moins 3 fois chaque jour d'exposition et pour chaque niveau d'exposition. En cas d'impossibilité en raison de débits d'air limités ou de faibles concentrations, l'utilisation d'un échantillon par période d'exposition est acceptable. En principe, cet échantillon est alors recueilli pendant la totalité de la période d'exposition. Les écarts entre la concentration dans chaque chambre et la concentration moyenne n'excédent pas ± 10 % pour les gaz et vapeurs et ± 20 % pour les aérosols liquides ou solides. Il convient de calculer et de noter le temps d'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}). La durée d'une exposition couvre le temps de production de la substance d'essai, y compris le temps nécessaire pour l'égalisation des concentrations dans la chambre d'exposition (t_{95}) et leur déclin. Des indications pour l'estimation de t_{95} sont fournies dans le document d'orientation 39 (2).

28. Pour des systèmes très complexes constitués de gaz ou vapeurs et d'aérosols (atmosphères de combustion ou substance d'essai propulsés à partir de produits/dispositifs spécialisés, par exemple), chaque phase peut se comporter différemment dans la chambre d'inhalation. Pour chacune des phases (gaz ou vapeur et aérosol), on choisira donc au moins une substance indicatrice (analyte), en général le principal principe actif du mélange. Quand la substance d'essai est un mélange, la concentration analytique devra être indiquée pour la préparation totale et pas uniquement pour le principe actif ou la substance indicatrice (analyte). Pour plus d'informations sur les concentrations réelles, se reporter au document d'orientation 39 (2).

Substance d'essai: répartition granulométrique

29. La répartition granulométrique des aérosols est déterminée au minimum chaque semaine pour chaque niveau de concentration, à l'aide d'un impacteur en cascade ou d'un autre instrument, comme un spectromètre de mesure de la taille des particules aérodynamiques (APS). Si les résultats obtenus avec l'impacteur en cascade et l'autre instrument se révèlent équivalents, ce dernier peut être utilisé tout au long de l'étude.

▼M4

30. Pour confirmer la capacité de recueil des particules de l'outil principal, un second instrument devra être utilisé en parallèle, par exemple un filtre gravimétrique ou un barboteur à gaz/impacteur. La concentration massique obtenue par l'analyse granulométrique se rapproche, dans des limites raisonnables, de celle obtenue par l'analyse sur filtre, voir document d'orientation 39 (2). Si pour toutes les concentrations testées, cette équivalence est établie au début de la phase d'étude, il n'est pas nécessaire d'effectuer des mesures de confirmation dans la suite de l'étude. Pour le bien-être des animaux, il convient de réduire au minimum les données douteuses qui nécessiteraient de répéter l'essai.

31. Une répartition granulométrique est effectuée dans le cas des vapeurs, s'il est possible qu'une condensation de la vapeur conduise à la formation d'un aérosol, ou si des particules sont détectées dans une atmosphère de vapeur susceptible de présenter des phases mixtes.

OBSERVATIONS

32. Un examen clinique attentif des animaux est pratiqué avant, pendant, et après la période d'exposition. Des observations plus fréquentes peuvent être réalisées en fonction de la réponse des animaux pendant l'exposition. Lorsque l'observation des animaux s'avère difficile en raison des tubes de contention, du mauvais éclairage des chambres d'exposition «corps entier» ou d'atmosphères opaques, les animaux seront observés attentivement après l'exposition. Les observations effectuées avant l'exposition du lendemain peuvent permettre d'estimer une éventuelle réversibilité ou exacerbation des effets toxiques.

33. Toutes les observations sont enregistrées individuellement pour chaque animal. Quand des animaux sont retrouvés morts ou sont euthanasiés, l'heure de la mort est consignée le plus précisément possible.

34. Les observations quotidiennes portent notamment sur les modifications de la peau et des poils, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux, ainsi que de l'activité somatomotrice et du comportement. Les tremblements, les convulsions, la salivation, les diarrhées, la léthargie, le sommeil et le coma retiennent l'attention. La mesure de la température rectale peut aider à mettre en évidence une bradypnée réflexe ou une hypo/hyperthermie liée au traitement ou au confinement. Il est possible d'enrichir le protocole d'étude par des estimations complémentaires telles que: cinétique, surveillance biologique, fonction pulmonaire, rétention de produits peu solubles qui s'accumulent dans les tissus pulmonaires et changements comportementaux.

POIDS CORPOREL

35. Le poids de chacun des animaux est enregistré individuellement: juste avant la première exposition (jour 0), deux fois par semaine par la suite (par exemple les vendredis et lundis, afin de mettre en évidence leur rétablissement après un week-end sans exposition, ou dans un délai permettant l'évaluation de la toxicité systémique), et au moment de leur mort ou de leur euthanasie. Si aucun effet n'est observé les 4 premières semaines, le poids corporel peut n'être mesuré qu'une fois par semaine pendant le reste de l'étude. Les animaux du groupe satellite (étude de réversibilité) sont toujours pesés de façon hebdomadaire tout au long de la période de récupération. Au terme de l'étude, tous les animaux sont pesés juste avant leur sacrifice pour ne pas fausser le calcul des rapports du poids des organes au poids du corps.

CONSOMMATION DE NOURRITURE ET D'EAU

36. La quantité de nourriture consommée est mesurée une fois par semaine. La consommation d'eau peut également l'être.

▼M4

PATHOLOGIE CLINIQUE

37. Tous les animaux, y compris ceux des groupes témoins et satellites, quand ils sont sacrifiés, subissent des examens cliniques. Le délai entre la fin de l'exposition et la prise de sang est enregistré, en particulier quand la reconstitution de l'effet visé est rapide. À la fin de l'exposition, un échantillonnage est recommandé pour les paramètres ayant une courte demi-vie plasmatique (HbCO, ChE et MetHb, par exemple).

38. Le tableau 1 énumère les paramètres de pathologie clinique généralement requis pour toutes les études toxicologiques. Une analyse d'urine n'est pas nécessaire en règle générale, mais peut être réalisée si on l'estime utile d'après la toxicité probable ou observée. Afin de mieux caractériser la toxicité de la substance d'essai, le directeur de l'étude peut faire appel à d'autres paramètres (cholinestérase, lipides, hormones, équilibre acido-basique, méthémoglobine ou corps de Heinz, créatine kinase, rapport myéloïde/érythroïde, troponines, gaz du sang, lactate déshydrogénase, sorbitol déshydrogénase, glutamate déshydrogénase, gamma glutamyl transpeptidase, etc.).

Tableau 1

Paramètres standards de pathologie clinique

Hématologie	
Nombre d'érythrocytes	Nombre total de leucocytes
Hématocrite	Différentiel leucocytaire
Concentration d'hémoglobine	Nombre de plaquettes sanguines
Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine	Potentiel de coagulation (en choisir un):
Volume corpusculaire moyen	— Temps de prothrombine
Concentration corpusculaire moyenne d'hémoglobine	— Temps de coagulation
Réticulocytes	— Temps de thromboplastine partielle
Chimie clinique	
Glucose (*)	Alanine aminotransférase
Cholestérol total	Aspartate aminotransférase
Triglycérides	Phosphatase alcaline
Azote uréique dans le sang	Potassium
Bilirubine totale	Sodium
Créatinine	Calcium
Protéines totales	Phosphore
Albumine	Chlorure
Globuline	
Analyse d'urine (facultative)	
Apparence (couleur et turbidité)	Protéines totales
Volume	Glucose
Densité ou osmolarité	Sang/cellules sanguines
pH	

(*) Le directeur d'étude décidera si une période de jeûne est nécessaire ou non pour les animaux, une longue période de jeûne pouvant conduire à des mesures de glucose partiellement erronées pour les animaux traités par rapport aux animaux témoins. La période de jeûne est appropriée à l'espèce utilisée: pour le rat, elle peut être de 16 heures environ (jeûne pendant la nuit). La détermination de la glycémie à jeun peut être effectuée après la période de jeûne de la nuit, pendant la dernière semaine d'exposition, ou après la période de jeûne de la nuit précédant l'autopsie (avec, dans ce dernier cas, tous les autres paramètres de pathologie clinique).

▼M4

39. Quand il est prouvé que les voies respiratoires basses (c'est-à-dire les alvéoles pulmonaires) sont le principal site de dépôt et de rétention, le lavage broncho-alvéolaire (LBA) peut alors être la technique de choix pour effectuer une analyse quantitative des paramètres de la relation dose-effet basée sur les hypothèses, en se concentrant sur l'alvéolite, l'inflammation pulmonaire et la phospholipidose. Ceci permet d'étudier convenablement l'évolution de la relation dose-effet et du décours temporel d'une lésion alvéolaire. Le fluide du LBA peut être analysé en se basant sur le nombre total et différentiel de leucocytes, les protéines totales et la lactate déshydrogénase. D'autres paramètres peuvent également être considérés, comme ceux mettant en évidence une lésion lysosomale, une phospholipidose, une fibrose, une inflammation allergique ou irritante, laquelle peut inclure la détermination de cytokines ou de chimiokines pro-inflammatoires. Les mesures liées au LBA complètent souvent les résultats des examens histopathologiques sans toutefois s'y substituer. Des indications sur la manière de réaliser un lavage de poumon sont disponibles dans le document d'orientation 39 (2).

EXAMEN OPHTALMOLOGIQUE

40. À l'aide d'un ophthalmoscope ou d'un dispositif équivalent, un examen ophthalmologique du fond d'œil, des milieux de réfraction, de l'iris et de la conjonctivite est effectué avant l'administration de la substance d'essai pour tous les animaux, et au terme de l'étude pour tous les groupes témoins et groupes exposés à la concentration élevée. Si des changements dans les yeux sont décelés, tous les animaux des autres groupes sont examinés, y compris le groupe satellite (étude de réversibilité).

MACROPATHOLOGIE ET POIDS DES ORGANES

41. Tous les animaux d'expérience, y compris ceux morts au cours de l'essai et ceux écartés de l'étude pour des raisons de bien-être animal, subissent une exsanguination complète (si cela est possible) et une autopsie macroscopique. Il convient d'enregistrer le délai entre la fin de la dernière exposition de chaque animal et leur sacrifice. Lorsqu'un animal est découvert mort et que son autopsie n'est pas réalisable immédiatement, l'animal est réfrigéré (mais non congelé) à une température suffisamment basse pour minimiser l'autolyse. Les autopsies sont réalisées le plus tôt possible, en général dans un délai d'un à deux jours. Tous les changements macropathologiques sont enregistrés pour chaque animal en prêtant particulièrement attention aux voies respiratoires.

42. Le tableau 2 énumère les organes et tissus devant être conservés dans un milieu approprié lors de l'autopsie macroscopique en vue d'un examen histopathologique. La conservation des organes et tissus [entre crochets], et de tous les autres organes et tissus, est à la discrétion du directeur d'étude. Les organes indiqués **en gras** sont découpés et pesés à l'état humide, le plus tôt possible après la dissection, pour éviter leur dessiccation. La thyroïde et les épididymes ne sont pesés que si cela est nécessaire car leur découpe peut gêner l'évaluation histopathologique. Les organes et tissus sont fixés à l'aide de formol tamponné à 10 %, ou d'un autre fixateur approprié, dès que l'autopsie est effectuée, et pas moins de 24 à 48 heures avant le découpage, en fonction du fixateur utilisé.

▼M4

Tableau 2

Organes et tissus à conserver lors de l'autopsie macroscopique

Aorte	Moelle osseuse (et/ou un aspirat frais)
[Bulbe olfactif]	Muscle (cuisse)
Cæcum	Nerf périphérique (sciatique ou tibial, de préférence proche du muscle)
Capsules surrénales	Œsophage
Cerveau (y compris segments d'hémisphères, cervelet et bulbe rachidien/pont)	**Ovaires**
Cœur	Pancréas
Côlon	Parathyroïdes
Dents	Peau
Duodénum	**Poumons** (tous les lobes sur un niveau, y compris les bronches principales)
[Épididymes]	Prostate
Fémur avec articulation	**Rate**
Foie	Rectum
Ganglions lymphatiques (distaux par rapport au site d'entrée)	**Reins**
Ganglions lymphatiques depuis la région hilaire du poumon, en particulier pour les substances particulaires peu solubles. Pour des examens plus approfondis et/ou des études à but immunologique, d'autres ganglions lymphatiques peuvent être envisagés, comme ceux des régions médiastinale, cervicale/submandibulaire et/ou auriculaire.	Sternum
	Testicules
	Thymus
	Thyroïde
[Glandes de Harder]	Tissus nasopharyngés [au moins 4 niveaux; 1 niveau comprenant le conduit nasopharyngien et le tissu lymphoïde associé à la muqueuse nasale (NALT)]
[Glandes lacrymales (extraorbitales)]	Trachée (au moins 2 niveaux comprenant 1 coupe longitudinale le long de la carène et 1 coupe transversale)
Estomac	[Uretère]
Glande mammaire (femelles)	[Urètre]
Glandes salivaires	**Utérus**
Hypophyse	Vésicule biliaire (si présente)
Iléon	Vésicules séminales
Jénunum	Vessie
[Langue]	[Yeux (rétine, nerf optique) et paupières]
Larynx (3 niveaux, dont la base de l'épiglotte)	Organes cibles
Moelle épinière (niveaux cervical, mésothoracique et lombaire)	Toutes les masses et lésions macroscopiques

▼M4

43. Les poumons sont retirés intacts, pesés et perfusés avec un fixateur approprié à une pression de 20 à 30 cm d'eau pour veiller à ce que l'architecture pulmonaire soit préservée (5). Les coupes sont recueillies pour tous les lobes sur un niveau comprenant les bronches principales. Si un lavage du poumon est réalisé, le lobe qui n'a pas été lavé est sectionné sur trois niveaux (pas de coupe en série).

44. Au moins 4 niveaux des tissus nasopharyngés sont examinés, dont un devant comporter le conduit nasopharyngien (5) (6) (7) (8) (9) pour permettre un examen adéquat de l'épithélium squameux, transitionnel (respiratoire non-cilié), respiratoire (respiratoire cilié) et olfactif, ainsi que du tissu lymphatique (NALT) (10) (11). Trois niveaux du larynx sont examinés, dont un comprenant la base de l'épiglotte (12). Au moins deux niveaux de la trachée sont examinés, y compris une coupe longitudinale le long de la carène de la bifurcation des bronches extrapulmonaires et une coupe transversale.

HISTOPATHOLOGIE

45. Une évaluation histopathologique de tous les organes et tissus du tableau 2 est réalisée pour les animaux des groupes témoins et des groupes exposés à une concentration élevée de la substance d'essai, ainsi que pour les animaux qui meurent ou sont sacrifiés au cours de l'étude. On portera une attention particulière aux voies respiratoires, aux organes cibles et aux lésions macroscopiques. Les organes et tissus présentant des lésions dans le groupe exposé à une concentration élevée sont examinés pour tous les groupes. Le directeur de l'étude peut choisir de réaliser des évaluations histopathologiques pour d'autres groupes afin de mettre en évidence une relation concentration-réponse claire. Lorsqu'un groupe satellite (étude de réversibilité) est utilisé, il y a lieu d'effectuer un examen histopathologique pour tous les tissus et organes ayant laissé apparaître des effets dans les groupes traités. Lorsqu'un trop grand nombre de morts précoces ou d'autres problèmes survenant dans le groupe exposé à une concentration élevée compromettent la portée des résultats, le groupe exposé à la concentration immédiatement inférieure subit un examen histopathologique. On tentera de corréler les observations macroscopiques et les constatations au niveau microscopique.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Données

46. Pour chacun des animaux, les données suivantes sont fournies: poids corporel, consommation de nourriture, pathologie clinique, pathologie macroscopique, poids des organes et histopathologie. Les résultats des observations cliniques sont résumés sous la forme de tableaux et indiquent pour chaque groupe d'essai: le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes spécifiques de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, l'heure de la mort de chacun des animaux, la description et l'évolution dans le temps des effets toxiques ainsi que leur réversibilité, et les conclusions de l'autopsie. Tous les résultats, quantitatifs et fortuits, sont évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique généralement reconnue peut être utilisée; il y a lieu de sélectionner les méthodes statistiques au stade de la conception de l'étude.

Rapport d'essai

47. Le rapport d'essai contient, s'il y a lieu, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience et conditions d'élevage

— Description des conditions d'encagement, y compris: nombre (ou évolution du nombre) d'animaux par cage, matériel de litière, température ambiante et taux d'humidité relative, photopériode et identification du régime alimentaire.

▼M4

— Espèces/souches utilisées et justification éventuelle de l'utilisation d'une espèce autre que le rat. Des données sources et historiques peuvent être fournies si elles correspondent à des animaux soumis à des conditions d'exposition, d'encagement et de jeûne similaires.

— Nombre, âge et sexe des animaux.

— Méthode de randomisation.

— Description d'un éventuel conditionnement préalable à l'essai, tel que régime alimentaire, quarantaine ou traitement de maladie.

Substance d'essai

— Nature physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (y compris isomérisation).

— Données d'identification et numéro CAS (Chemical Abstract Services) s'il est connu.

Véhicule

— Justification de l'emploi d'un véhicule et justification de son choix (s'il ne s'agit pas de l'eau).

— Données historiques ou concordantes démontrant que le véhicule n'interfère pas avec les résultats de l'étude.

Chambre d'inhalation

— Description détaillée de la chambre d'inhalation, y compris son volume et son schéma.

— Source et description de l'équipement utilisé pour l'exposition des animaux et pour la production de l'atmosphère.

— Équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité, la granulométrie et la concentration réelle.

— Source d'air et système de climatisation utilisé.

— Méthodes utilisées pour étalonner l'équipement afin d'assurer l'homogénéité de l'atmosphère d'essai.

— Différence de pression (positive ou négative).

— Orifices d'exposition par chambre («nez seul») ou emplacement des animaux dans la chambre («corps entier»).

— Stabilité de l'atmosphère d'essai.

— Situation des capteurs thermiques et hygrométriques et échantillonnage de l'atmosphère d'essai dans la chambre d'exposition.

— Traitement de l'air fourni/évacué.

— Débits d'air, débit d'air/orifice d'exposition («nez seul») ou rapport du volume de l'animal à la chambre («corps entier»).

— Temps nécessaire pour atteindre l'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}).

— Nombre de changements de volume par heure.

— Doseurs (s'il y en a).

Données concernant l'exposition

— Justification du choix de la concentration cible dans l'étude principale.

▼M4

— Concentrations nominales (masse totale de la substance d'essai produite dans la chambre d'inhalation, divisée par le volume d'air traversant la chambre).

— Concentrations réelles de la substance d'essai obtenues dans la zone où respirent les animaux; pour les mélanges à tester produisant des formes physiques hétérogènes (gaz, vapeurs, aérosols), chacun des constituants peut être analysé séparément.

— Toutes les concentrations atmosphériques sont rapportées en unités de masse (mg/l, mg/m^3, etc.) plutôt qu'en unités de volume (ppm, ppb, etc.).

— Répartition granulométrique des particules, diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) et écart type géométrique (σ_g), ainsi que leur méthode de calcul. Les autres analyses de la taille de particules sont consignées.

Conditions expérimentales

— Détails sur la préparation de la substance d'essai, y compris sur les procédures utilisées pour réduire la taille des particules des matériaux solides ou pour préparer les solutions de la substance d'essai.

— Description (si possible avec schéma) de l'équipement utilisé pour produire l'atmosphère d'essai et pour exposer les animaux à celle-ci.

— Détails sur l'équipement utilisé pour contrôler la température et le taux d'humidité de la chambre ainsi que le débit d'air dans la chambre (réalisation d'une courbe d'étalonnage).

— Détails sur l'équipement utilisé pour recueillir les échantillons servant à déterminer les concentrations dans la chambre et la répartition granulométrique.

— Détails sur la méthode de chimie analytique utilisée et la méthode de validation (notamment rendement de récupération de la substance d'essai à partir du milieu d'échantillonnage).

— Méthode de randomisation utilisée pour l'assignation des animaux aux groupes d'essai et aux groupes témoins.

— Détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (notamment origine/type de régime alimentaire, origine de l'eau).

— Justification du choix des concentrations d'essai.

Résultats

— Tableau présentant la température, le taux d'humidité et le débit d'air dans la chambre d'inhalation.

— Tableau de données sur les concentrations nominales et réelles dans la chambre d'inhalation.

— Tableau de données sur la taille des particules, notamment données analytiques sur le prélèvement d'échantillons, la répartition granulométrique et les calculs du DAMM et de σ_g.

— Tableau de données sur les réponses et le niveau de concentration pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris de mortalité, et nature, sévérité, moment d'apparition et durée des effets).

▼**M4**

— Tableau du poids de chacun des animaux.

— Tableau de la consommation de nourriture.

— Tableau des résultats de pathologie clinique.

— Pour chaque animal, résultats de l'autopsie et observations histopathologiques disponibles.

Discussion et interprétation des résultats

— Un effort particulier est consacré à la description des méthodes utilisées pour répondre aux critères de la présente méthode d'essai, par exemple en ce qui concerne la concentration limite ou la taille des particules.

— La respirabilité des particules est abordée à la lumière des résultats d'ensemble, en particulier si les critères de taille des particules n'ont pu être remplis.

— La cohérence des méthodes utilisées pour déterminer les concentrations nominales et réelles, et la relation entre la concentration réelle et la concentration nominale, sont incluses dans l'appréciation d'ensemble de l'étude.

— La cause probable de la mort et le mode d'action prédominant (systémique ou local) sont abordés.

— Une explication est apportée s'il a fallu euthanasier des animaux qui souffraient ou montraient des signes de détresse sévère et persistante, en se basant sur les critères du document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (3).

— Le ou les organes cibles sont identifiés.

— La concentration sans effet nocif observé (CSENO) et la concentration minimale avec effet nocif observé (CMENO) sont déterminées.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) OCDE (1981). Toxicité subchronique par inhalation, Ligne directrice n° 413 d'origine, direction de l'environnement, OCDE, Paris.

(2) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(3) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Évaluation, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.

(4) Whalan E. and Redden J.C. (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth D.L., Tyler W.S., Plopper C.E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material,* Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, p. 229-258.

(6) Young J.T. (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

(7) Harkema J.R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A., van Slootweg P.J., Feron V.J. (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes M.P. and Ward J.M. (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M., Morgan K.T. (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

(10) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hameleers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C., Sminia T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

(11) Kuper C.F., Arts J.H.E., Feron V.J. (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

(12) Lewis D.J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

(13) Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006 (JO L 353 du 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

Appendice 1

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼M4

B.30. ÉTUDES DE TOXICITÉ CHRONIQUE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 452 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (2009). La ligne directrice 452 initiale avait été adoptée en 1981. La révision de cette méthode B.30 a été jugée nécessaire afin de tenir compte des évolutions récentes dans le domaine du bien-être animal, ainsi que des nouvelles exigences réglementaires (1) (2) (3) (4). La mise à jour de la méthode d'essai B.30 a été effectuée en parallèle avec la révision des chapitres B.32 (Études de cancérogenèse) et B.33 (Études combinées de toxicité chronique et de cancérogenèse) de la présente annexe, dans le but d'obtenir des informations additionnelles à partir des animaux utilisés dans l'étude, et de fournir des précisions concernant le choix des doses. La présente méthode d'essai vise les essais portant sur une large gamme de produits chimiques, dont des pesticides et des produits chimiques industriels.

2. La plupart des études de toxicité chronique étant menées sur des espèces de rongeurs, la présente méthode d'essai est destinée à s'appliquer principalement à des études réalisées avec ces espèces. S'il s'avérait nécessaire de mener de telles études avec des non-rongeurs, les principes et procédures décrits dans la présente méthode d'essai et dans le chapitre B.27 de la présente annexe (Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours) (5) pourront aussi être appliqués, moyennant des modifications appropriées, comme indiqué dans le document d'orientation de l'OCDE n° 116 sur l'élaboration et la conduite des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (6).

3. Les trois principales voies d'administration utilisées dans les études de toxicité chronique sont la voie orale, la voie cutanée et l'inhalation. Le choix de la voie d'administration dépend des caractéristiques physiques et chimiques de la substance d'essai, et de la voie d'exposition prédominante chez l'homme. Des informations complémentaires sur le choix de la voie d'exposition sont fournies dans le document d'orientation n° 116 (6).

4. La présente méthode d'essai porte essentiellement sur l'exposition par voie orale, la voie la plus communément utilisée dans les études de toxicité chronique. Bien que des études de toxicité chronique à long terme utilisant l'exposition par voie cutanée ou par inhalation puissent aussi être nécessaires pour évaluer le risque pour la santé humaine et/ou exigées en vertu de certains régimes réglementaires, ces deux voies d'exposition nécessitent des dispositifs techniques d'une grande complexité. De telles études devront être conçues au cas par cas, encore que la présente méthode d'essai, qui porte sur la caractérisation et l'évaluation de la toxicité chronique par voie orale, puisse fournir les bases d'un protocole d'étude par voie cutanée et/ou l'inhalation, notamment en ce qui concerne les recommandations relatives aux durées de traitement, aux paramètres cliniques et pathologiques, etc. Il existe des documents d'orientation de l'OCDE sur l'administration expérimentale de substances d'essai par inhalation (6) (7) et par voie cutanée (6). Les chapitres B.8 (8) et B.29 (9) de la présente annexe, ainsi que le document d'orientation de l'OCDE sur les essais de toxicité aiguë par inhalation (7) doivent en particulier être consultés lors de la conception d'études à plus long terme portant sur une exposition par inhalation. Le chapitre B.9 de la présente annexe (10) doit être consulté dans le cas d'un essai par voie cutanée.

▼M4

5. L'étude de toxicité chronique donne des éléments d'information sur les risques pour la santé susceptibles de découler d'une exposition répétée sur une portion considérable de la durée de vie des espèces employées. L'étude fournit des informations sur les effets toxiques de la substance d'essai, et indiquera les organes cibles et la possibilité d'accumulation dans ces organes. Elle peut aussi donner une estimation de la dose sans effet nocif observé, qui permet d'établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine. De plus, il convient d'accorder une attention particulière à l'observation clinique des animaux afin d'obtenir le plus d'informations possible.

6. Les objectifs des études couvertes par la présente méthode d'essai sont les suivants:

— identification de la toxicité chronique d'une substance d'essai,

— identification des organes cibles,

— caractérisation de la relation dose-effet,

— identification d'un niveau de dose sans effet nocif observé (DSENO) ou du point de départ pour l'établissement d'une dose de référence (DR),

— prévision des effets de toxicité chronique aux niveaux représentatifs de l'exposition humaine,

— obtention de données permettant de vérifier les hypothèses concernant le mode d'action (6).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

7. Lors de l'évaluation des caractéristiques toxicologiques d'une substance chimique d'essai, le laboratoire chargé de l'étude prend en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de réaliser l'étude, afin de pouvoir orienter celle-ci de manière à tester plus efficacement le potentiel de toxicité chronique, et faire le moins possible appel aux animaux. Les informations utiles pour concevoir l'étude sont notamment: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les informations éventuelles sur son mode d'action; les résultats d'éventuelles études de toxicité in vitro ou in vivo; l'utilisation (les utilisations) prévue(s) et le potentiel d'exposition humaine; les données Q(SAR) disponibles et les données toxicologiques relatives aux substances chimiques structurellement apparentées; les données toxicocinétiques disponibles (dose unique et doses répétées, si ces données existent) et les résultats d'autres études à doses répétées. La détermination de la toxicité chronique n'est effectuée qu'après obtention des premiers résultats d'essais de toxicité à doses répétées sur 28 jours et/ou 90 jours. Il convient d'envisager l'adoption d'une approche par étapes pour les essais de toxicité chronique entrepris dans le cadre de l'évaluation globale des effets nocifs potentiels d'une substance d'essai particulière (11) (12) (13) (14).

8. Les méthodes statistiques les plus appropriées pour l'analyse des résultats, compte tenu du plan expérimental et des objectifs de l'étude, sont identifiées avant le début de l'étude. Il convient notamment de déterminer si les statistiques doivent prendre en compte l'ajustement en fonction de la survie et l'analyse effectuée en cas de mort prématurée des animaux d'un ou plusieurs groupes. On trouvera des indications concernant les analyses statistiques appropriées, ainsi que des références clés à des méthodes statistiques reconnues au plan international, dans le document d'orientation n° 116 (6) ainsi que dans le document d'orientation n° 35 sur l'analyse et l'évaluation des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (15).

▼M4

9. Lors de la réalisation d'une étude de toxicité chronique, il est recommandé de toujours suivre les principes et considérations énoncés dans le document d'orientation n° 19 de l'OCDE sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques en tant qu'effets mesurés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité (16). Le paragraphe 62 de ce document, en particulier, stipule ce qui suit: «*Dans les études comportant l'administration de doses répétées, lorsqu'un animal présente des signes cliniques progressifs de détérioration de son état, une décision d'euthanasier ou non l'animal est prise en connaissance de cause. Cette décision met en balance des facteurs tels que la valeur des informations pouvant être obtenues en maintenant l'animal dans l'étude d'une part, et l'état général de celui-ci d'autre part. Si la décision est prise de poursuivre l'essai sur cet animal, la fréquence des observations est augmentée selon les besoins. Il est aussi possible, sans toutefois nuire à l'objectif de l'essai, d'interrompre l'administration de la substance d'essai pour soulager la douleur ou la détresse de l'animal, ou de réduire la dose testée.*»

10. On trouvera des informations détaillées et une discussion sur les principes déterminant le choix des doses pour les études de toxicité chronique et de cancérogenèse dans le document d'orientation n° 116 (6) ainsi que dans deux publications de l'Institut international des sciences de la vie (17) (18). La stratégie de base pour le choix des doses dépend du ou des objectifs principaux de l'étude (paragraphe 6). En choisissant des niveaux de dose appropriés, il convient de trouver un équilibre entre, d'une part, l'identification des dangers et, d'autre part, la caractérisation des réponses aux faibles doses et leur pertinence. Cet équilibre est particulièrement nécessaire dans le cas où une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (chapitre B.33 de la présente annexe) est menée (paragraphe 11).

11. Il convient d'examiner l'opportunité de réaliser une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (chapitre B.33 de la présente annexe), plutôt que de réaliser séparément une étude de toxicité chronique (la présente méthode d'essai B.30) et une étude de cancérogenèse (chapitre B.32 de la présente annexe). L'essai combiné permet une meilleure efficacité en temps et en coûts, par rapport à la conduite de deux essais séparés, et ne compromet pas la qualité des données de la phase chronique ou de la phase de cancérogenèse. Toutefois, les principes déterminant le choix de la dose (paragraphes 9 et 20-25) sont respectés rigoureusement lors de la réalisation d'une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (chapitre B.33 de la présente annexe); il est reconnu également que certains cadres réglementaires peuvent imposer la conduite d'études séparées.

12. Les définitions utilisées dans le contexte de la présente méthode d'essai figurent dans le document d'orientation n° 116 (6).

PRINCIPE DE L'ESSAI

13. La substance d'essai est administrée quotidiennement à plusieurs groupes d'animaux d'expérience à des doses progressives, en général pendant une période de 12 mois, bien que des durées plus longues ou plus courtes puissent aussi être choisies, en fonction des exigences réglementaires (voir paragraphe 33). Cette durée est assez longue pour permettre aux effets de toxicité cumulée de se manifester, tout en évitant les effets perturbateurs des changements liés au vieillissement. Les déviations par rapport à une durée d'exposition de 12 mois sont justifiées, surtout dans le cas de durées plus courtes. La substance d'essai est normalement administrée par voie orale, mais la voie inhalatoire ou la voie cutanée peut aussi être appropriée. Un ou plusieurs sacrifices en cours d'étude peuvent aussi être prévus, par exemple à 3 et 6 mois, auquel cas des groupes d'animaux supplémentaires pourront être enrôlés (voir paragraphe 19). Au cours de la période d'administration, les animaux sont examinés soigneusement afin de déceler tout signe de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont sacrifiés en cours d'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont sacrifiés et autopsiés.

▼M4

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Choix des espèces animales

14. La présente méthode d'essai traite principalement de la caractérisation et de l'évaluation de la toxicité chronique chez les rongeurs (voir paragraphe 2), bien que certains régimes réglementaires puissent exiger la réalisation d'études similaires chez des non-rongeurs. Dans ce cas, le choix de l'espèce est justifié. S'il s'avérait nécessaire de réaliser des études de toxicité chronique avec des non- rongeurs, le plan et la conduite de l'étude devraient être conformes aux principes décrits dans la présente méthode d'essai ainsi qu'au chapitre B.27 de la présente annexe (Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours) (5). Des informations additionnelles sur le choix des espèces et des souches sont disponibles dans le document d'orientation n° 116 (6).

15. La présente méthode d'essai se rapporte essentiellement au rat, mais d'autres espèces de rongeurs, comme la souris, peuvent être utilisées. Les rats et les souris sont les modèles expérimentaux choisis de préférence, en raison de leur courte durée de vie, de leur utilisation fréquente dans les études pharmacologiques et toxicologiques, de leur sensibilité à l'induction de tumeurs, et de la disponibilité de souches suffisamment caractérisées. Ces caractéristiques permettent d'obtenir une grande quantité d'informations sur la physiologie et la pathologie de ces animaux. Il convient d'employer de jeunes animaux adultes sains, de souches communément utilisées dans les laboratoires. L'étude de toxicité chronique sera effectuée de préférence sur des animaux de même souche et de même provenance que ceux utilisés dans l'étude (les études) de toxicité préliminaire(s) de plus courte durée. Les femelles sont nullipares et non gravides.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

16. Les animaux peuvent être logés individuellement ou réunis dans des cages en petits groupes du même sexe, l'hébergement individuel n'étant à envisager que dans des cas scientifiquement justifiés (19) (20) (21). Les cages sont placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats soit réduite au minimum. La température du local des animaux d'expérience est de 22 °C (± 3 °C). L'humidité relative est d'au moins 30 % et n'excède pas de préférence 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit comprise entre 50 et 60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire peut être un régime classique de laboratoire, avec eau potable à satiété. Il satisfait tous les besoins nutritionnels de l'espèce étudiée, et la teneur en contaminants alimentaires susceptibles d'influer sur les résultats de l'essai (résidus de pesticides, polluants organiques persistants, phyto-œstrogènes, métaux lourds et mycotoxines, par exemple) est aussi faible que possible. Des données analytiques sur les teneurs en nutriments et en contaminants alimentaires sont recueillies régulièrement, au moins au début de l'étude et lors des changements de lots; ces données figurent dans le rapport final. Des données analytiques sur l'eau de boisson utilisée dans le cadre de l'étude sont de même fournies. Le choix du régime alimentaire peut être influencé par la nécessité d'assurer un mélange convenable de la substance d'essai, et de satisfaire les besoins nutritionnels des animaux lorsque la substance d'essai est administrée dans la nourriture.

Préparation des animaux

17. Il convient d'utiliser des animaux sains, acclimatés aux conditions de laboratoire depuis au moins 7 jours, et n'ayant jamais été soumis auparavant à des protocoles expérimentaux. Dans le cas des rongeurs, l'administration de la substance commence dès que possible après le sevrage et l'acclimatation, et de préférence avant l'âge de 8 semaines. L'espèce, la souche, la provenance, le sexe, le poids et l'âge des animaux d'expérience sont précisés. Au début de l'étude, la variation de poids des animaux de chaque sexe est minimale, et n'excède pas ± 20 % du poids moyen de tous les animaux étudiés, et ce pour chaque sexe séparément. Les animaux sont affectés de manière aléatoire aux différents groupes (témoins et traités). Après la randomisation, les poids moyens des groupes de chaque sexe ne présentent pas de

▼M4

différences significatives. En cas de différences statistiquement significatives, la phase de randomisation est répétée dans la mesure du possible. Chaque animal reçoit un numéro d'identification unique et en est marqué de manière permanente par tatouage, implant de micro-puce ou toute autre méthode appropriée.

PROTOCOLE

Nombre et sexe des animaux

18. Il convient d'utiliser des animaux des deux sexes. Leur nombre est suffisant pour qu'à la fin de l'étude, chaque groupe contienne un nombre de sujets permettant d'effectuer une évaluation statistique et biologique complète. Pour les rongeurs, il convient normalement d'employer au moins 20 animaux de chaque sexe à chaque niveau de dose, tandis que pour les non-rongeurs, un minimum de 4 animaux de chaque sexe par groupe est recommandé. Dans les études utilisant des souris, il peut être nécessaire de prévoir des animaux supplémentaires dans chaque groupe de dose pour pouvoir effectuer tous les examens hématologiques requis.

Sacrifices en cours d'étude, groupes satellites et animaux sentinelles

19. L'étude peut prévoir le sacrifice d'animaux en cours d'étude (au moins 10 animaux de chaque sexe par groupe), par exemple à 6 mois, afin de recueillir des données sur la progression des changements toxicologiques et des informations mécanistiques, si cela est scientifiquement justifié. Si l'on dispose déjà de ces données, obtenues antérieurement lors d'études de toxicité à doses répétées sur la substance d'essai, les sacrifices en cours d'étude peuvent ne pas être scientifiquement justifiés. Des groupes satellites peuvent également être constitués, afin de contrôler la réversibilité des éventuelles altérations toxicologiques induites par la substance chimique étudiée. En général, ces investigations portent uniquement sur les doses maximales de l'étude et sur le groupe témoin. Un groupe supplémentaire d'animaux sentinelles (généralement 5 animaux de chaque sexe) peut être inclus si nécessaire pour le suivi de l'état pathologique au cours de l'étude (22). Si des sacrifices en cours d'étude ou l'inclusion de groupes sentinelles ou satellites sont prévus, le nombre d'animaux utilisés dans l'étude est augmenté du nombre d'animaux que l'on prévoit de sacrifier avant l'achèvement de l'étude. Ces animaux sont normalement sujets aux mêmes observations que ceux soumis à la phase de toxicité chronique de l'étude principale, notamment en ce qui concerne le poids corporel, la prise d'aliments et d'eau, les mesures hématologiques et de biochimie clinique et les examens pathologiques. Toutefois, des dispositions peuvent aussi être prises (dans les groupes d'animaux sacrifiés en cours d'étude) pour limiter ces observations à des mesures essentielles spécifiques telles que la neurotoxicité ou l'immunotoxicité.

Groupes de dose et dosage

20. Le document d'orientation n° 116 (6), donne des indications sur tous les aspects du choix des doses et des écarts entre les doses. Il convient d'utiliser au moins trois doses et un groupe témoin, sauf si un essai limite est pratiqué (voir paragraphe 27). Les niveaux de doses seront généralement basés sur les résultats d'études à plus court terme à doses répétées, ou d'études préliminaires de détermination des concentrations, et prennent en compte toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques existantes relatives à la substance d'essai ou aux substances chimiques apparentées.

▼**M4**

21. À moins de contraintes dues à la nature physico-chimique ou aux effets biologiques de la substance d'essai, le niveau de dose le plus élevé est choisi de manière à permettre d'identifier les principaux organes cibles et les effets toxiques de la substance, tout en évitant la souffrance, une toxicité sévère ou une forte morbidité ou létalité chez les animaux testés. Compte tenu des facteurs présentés au paragraphe 22 ci-dessous, le niveau de dose le plus élevé est choisi pour provoquer une manifestation de toxicité, par exemple un ralentissement de la prise de poids corporel (d'environ 10 %).

22. Toutefois, en fonction des objectifs de l'étude (voir paragraphe 6), on pourra choisir un niveau de dose maximal plus faible que la dose qui provoque des signes de toxicité; par exemple une dose entraînant un effet indésirable préoccupant, mais dont l'impact sur l'espérance de vie ou le poids corporel reste faible. La dose maximale ne dépasse pas 1 000 mg/kg de poids corporel (dose limite, voir paragraphe 27).

23. Les niveaux de dose et les intervalles entre les doses peuvent être choisis de manière à pouvoir établir une relation dose-réponse et une DSENO ou tout autre résultat escompté de l'étude, notamment une DR (voir paragraphe 25) au plus bas niveau de dose. Les facteurs à prendre en compte dans le choix des faibles doses sont notamment la pente attendue de la courbe dose-réponse, les doses qui provoquent des changements métaboliques importants ou qui modifient notablement le mode d'action toxique, le niveau auquel on peut prévoir un seuil, ou celui auquel on peut prévoir de fixer un point de départ pour une extrapolation aux faibles doses.

24. Les intervalles entre les doses dépendront des caractéristiques de la substance d'essai, et ne peuvent donc pas être prescrits dans la présente méthode d'essai, mais des intervalles correspondant à un facteur 2 ou 4 sont souvent les plus appropriés entre les doses décroissantes, et l'inclusion d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation de très grands intervalles (correspondant par exemple à un facteur de plus de 6 à 10) entre les doses. En général, les facteurs supérieurs à 10 sont évités, et leur utilisation fait l'objet d'une justification.

25. Comme le précise le document d'orientation n° 116 (6), les facteurs à prendre en compte dans le choix des doses sont notamment les suivants:

— non-linéarités ou points d'inflexion connus ou supposés de la courbe dose-réponse,

— toxicocinétique et gammes de doses auxquelles l'induction métabolique, la saturation ou la non-linéarité entre des doses externes et internes surviennent ou non,

— lésions précurseurs, marqueurs d'effets ou indicateurs du déroulement de processus biologiques clés sous-jacents,

— aspects principaux (ou présumés) du mode d'action, par exemple doses auxquelles une cytotoxicité commence à se manifester, les dosages hormonaux sont perturbés, les mécanismes homéostatiques sont dépassés, etc.,

— régions de la courbe dose-réponse nécessitant une estimation particulièrement précise, par exemple dans le domaine de la DR prévue ou d'un seuil présumé,

— prise en compte des niveaux prévus d'exposition humaine.

▼M4

26. Le groupe témoin est un groupe non-traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance d'essai est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance d'essai, les animaux du groupe témoin sont traités de la même manière que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé pour les groupes traités. Si la substance d'essai est incorporée aux aliments et entraîne une diminution sensible de la prise de nourriture liée à une moindre appétence de celle-ci, il pourra être utile d'utiliser un groupe témoin supplémentaire nourri en parallèle, qui constituerait un témoin plus approprié.

27. S'il est possible d'anticiper, en se basant sur les résultats d'études préliminaires, qu'un essai à dose unique, équivalant au moins à 1 000 mg/kg poids corporel/jour, réalisé en suivant les procédures décrites pour la présente étude, ne produira probablement pas d'effets indésirables, et si la toxicité est improbable compte tenu des données disponibles sur les substances chimiques structurellement apparentées, on peut considérer qu'une étude complète à trois niveaux de dose n'est pas indispensable. Une limite de 1 000 mg/kg poids corporel/jour peut s'appliquer sauf si l'exposition humaine indique qu'il est nécessaire de recourir à un niveau de dose plus élevé.

Préparation des doses et administration de la substance d'essai

28. La substance d'essai est normalement administrée par voie orale, soit dans la nourriture ou l'eau de boisson, soit par gavage. Des informations complémentaires sur les voies et méthodes d'administration figurent dans le document d'orientation n° 116 (6). La voie et le mode d'administration dépendent de la finalité de l'étude, des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai, de sa biodisponibilité, ainsi que de la voie et du mode prédominants d'exposition humaine. Il convient de justifier le choix de la voie et du mode d'administration. Dans l'intérêt des animaux, le gavage oral n'est normalement choisi que pour les substances pour lesquelles cette voie et ce mode d'administration correspondent à une voie d'exposition potentielle raisonnable chez l'homme (produits pharmaceutiques, par exemple). Dans le cas des produits chimiques alimentaires ou environnementaux, notamment les pesticides, l'administration se fait d'ordinaire via le régime alimentaire ou l'eau de boisson. Toutefois, dans certains contextes, tels que l'exposition professionnelle, l'administration par d'autres voies peut être plus appropriée.

29. Si nécessaire, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Il convient de prendre en compte les caractéristiques suivantes du véhicule et des autres additifs, s'il y a lieu: effets sur l'absorption, la répartition, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité; et effets sur la prise d'aliments ou d'eau, ou sur l'état nutritionnel des animaux. Il est recommandé, chaque fois que les circonstances le permettent, d'envisager en premier lieu l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse, puis celle d'une solution ou d'une émulsion dans une huile (par exemple huile de maïs), et en dernier lieu celle d'une solution dans d'autres véhicules. Les caractéristiques de toxicité des véhicules autres que l'eau sont connues. Il convient de disposer d'informations sur la stabilité de la substance d'essai et sur l'homogénéité des solutions ou rations contenant les différentes doses (selon les cas) dans les conditions d'administration (nourriture, par exemple).

30. Il importe de veiller à ce que les quantités de substances administrées dans les aliments ou l'eau de boisson n'interfèrent pas avec la nutrition ou avec l'équilibre hydrique. Dans les études de toxicité à long terme faisant intervenir une administration par voie alimentaire, la concentration de la substance d'essai dans les aliments ne dépasse pas normalement 5 % de la ration totale, afin d'éviter les déséquilibres nutritionnels. Si la substance d'essai est incorporée à la nourriture, on peut utiliser soit une concentration alimentaire constante (mg/kg d'aliment ou ppm), soit un niveau de dose constant par rapport au poids corporel de l'animal (mg/kg de poids corporel), calculé sur une base hebdomadaire. La solution choisie est spécifiée.

▼M4

31. En cas d'administration par voie orale, les animaux reçoivent une dose quotidienne de la substance d'essai (à raison de sept jours par semaine), et ce normalement pendant une période de 12 mois (voir également le paragraphe 33) encore qu'une durée plus longue puisse être requise selon les prescriptions réglementaires. Tout autre régime de dosage, par exemple une administration cinq jours par semaine, fait l'objet d'une justification. En cas d'administration par voie cutanée, les animaux reçoivent normalement le traitement pendant au moins 6 heures par jour, 7 jours par semaine, comme le précise le chapitre B.9 de la présente annexe (10), et ce pendant une période de 12 mois. L'exposition par inhalation est réalisée pendant 6 heures par jour, 7 jours par semaine, mais il est possible, si cela se justifie, de limiter l'exposition à 5 jours par semaine. La période d'exposition est normalement de 12 mois. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées «nez seul», il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Le choix d'une durée d'exposition inférieure à 6 heures par jour devra être justifié. Voir également le chapitre B.8 de la présente annexe (8).

32. Lorsque la substance d'essai est administrée aux animaux par gavage, l'opération est pratiquée aux mêmes moments de la journée au moyen d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Normalement, une dose unique sera administrée une fois par jour mais lorsque, par exemple, la substance chimique est un irritant local, il pourra être envisagé de maintenir la dose quotidienne en la fractionnant (deux fois par jour). Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal d'expérience. Le volume est maintenu aussi faible que possible et ne dépasse pas normalement 1 ml/100 g de poids corporel pour les rongeurs (22). Il convient de minimiser la variabilité du volume testé en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à tous les niveaux de doses. Les substances potentiellement corrosives ou irritantes sont l'exception et leur dilution permet d'éviter tout effet local sévère. Il convient d'éviter les concentrations d'essai susceptibles d'être corrosives ou irritantes pour le tube digestif.

Durée de l'étude

33. Bien que la présente méthode d'essai concerne principalement des essais de toxicité chronique d'une durée de 12 mois, le plan de l'étude permet une application de durée plus courte (6 à 9 mois par exemple) ou plus longue (18 à 24 mois), pour répondre aux exigences de régimes réglementaires particuliers ou obtenir des données mécanistiques spécifiques. Les déviations par rapport à une durée d'exposition de 12 mois font l'objet de justifications, surtout dans le cas de durées plus courtes. Les groupes satellites inclus pour contrôler la réversibilité des éventuelles altérations toxicologiques induites par la substance d'essai sont maintenus sans traitement, pendant une période d'au moins 4 semaines et d'au plus un tiers de la durée totale de l'étude, après la cessation de l'exposition. Le document d'orientation n° 116 (6) fournit des indications supplémentaires, notamment en ce qui concerne la survie des animaux d'expérience.

OBSERVATIONS

34. Tous les animaux sont soumis à un examen quotidien, généralement en début et en fin de journée, fins de semaine et jours fériés compris, pour déterminer la morbidité et la mortalité. Des observations cliniques sont effectuées au moins une fois par jour, de préférence au(x) même(s) moment(s) de la journée, en tenant compte du moment où l'on prévoit que les effets des différentes doses atteindront leur intensité maximale après administration par gavage.

▼M4

35. Tous les animaux font l'objet d'observations cliniques détaillées au moins une fois avant la première exposition (pour permettre des comparaisons intra-individuelles), à la fin de la première semaine de l'étude, et une fois par mois ensuite. Les observations respectent un protocole qui réduit au minimum les variations entre observateurs, et les rend indépendantes du groupe testé. Ces observations sont effectuées hors de la cage où sont logés les animaux, de préférence dans une enceinte normalisée et à heures fixes. Elles sont soigneusement consignées, de préférence en utilisant un système de cotation explicitement défini par le laboratoire qui réalise l'essai. Les conditions d'observation demeurent aussi constantes que possible. Les observations portent notamment porter sur les symptômes suivants (sans que cette liste soit exhaustive): modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux et des muqueuses, apparition de sécrétions et d'excrétions, et réactions neurovégétatives (par exemple, sécrétion de larmes, horripilation, variation du diamètre pupillaire, respiration anormale). Il convient également de consigner les changements dans la démarche, la posture et les réactions à la manipulation, ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques et les comportements stéréotypés (par exemple, toilettage excessif, parcours circulaires répétitifs) ou bizarres (par exemple, automutilation, marche à reculons) (24).

36. Avant la première administration de la substance d'essai, tous les animaux font l'objet d'un examen ophtalmologique effectué à l'aide d'un ophtalmoscope ou de tout autre appareil approprié. À l'issue de l'étude, cet examen est réalisé de préférence sur tous les animaux, mais au moins sur ceux du groupe traités à la dose la plus élevée et du groupe témoin. Si des altérations oculaires liées au traitement sont détectées, tous les animaux sont examinés. Si l'analyse structurale ou d'autres données suggèrent une toxicité oculaire, il faut augmenter la fréquence des examens oculaires.

37. Dans le cas de substances ayant présenté un potentiel d'induction d'effets neurotoxiques lors d'essais antérieurs de toxicité à doses répétées sur 28 jours et/ou 90 jours, une vérification de la réactivité sensorielle à différents types de stimuli (24) (stimuli auditifs, visuels ou proprioceptifs, par exemple) (25) (26) (27), et une évaluation de la force de préhension (28) ainsi que de l'activité motrice (29) pourront être menées en option. Elles seront réalisées avant le début de l'étude et tous les 3 mois par la suite, jusqu'à 12 mois inclusivement, ainsi qu'à la fin de l'étude (si celle-ci dure plus de 12 mois). On trouvera dans les références bibliographiques susmentionnées une description plus détaillée des modes opératoires. Toutefois, d'autres modes opératoires que ceux figurant dans ces références sont également utilisables.

38. Dans le cas de substances ayant présenté un potentiel d'induction d'effets immunotoxiques lors d'essais antérieurs de toxicité à doses répétées sur 28 jours et/ou 90 jours, d'autres examens sur cet effet peuvent être menés en option à la fin de l'étude.

Poids corporel, prise d'aliments et d'eau, et efficacité nutritionnelle

39. Tous les animaux sont pesés au début du traitement, au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. La prise d'aliments et l'efficacité alimentaire sont aussi mesurées au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Lorsque la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la prise d'eau est mesurée au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Il peut également être utile de mesurer la prise d'eau dans les études où celle-ci est modifiée.

▼M4

Hématologie et biochimie clinique

40. Dans les études faisant intervenir des rongeurs, des examens hématologiques sont effectués sur au moins 10 mâles et 10 femelles de chaque groupe, à 3, 6 et 12 mois, ainsi qu'à la fin de l'étude (si celle-ci dure plus de 12 mois), en utilisant les mêmes animaux tout au long de l'étude. Si des souris sont utilisées, il peut être nécessaire de constituer des groupes satellites afin de pouvoir effectuer tous les examens hématologiques requis (voir paragraphe 18). Dans les études faisant intervenir des non- rongeurs, les échantillons seront prélevés sur un plus petit nombre d'animaux (par exemple, 4 animaux de chaque sexe par groupe dans les études chez le chien) à des stades intermédiaires et à la fin de l'étude, de la même manière que chez les rongeurs. Il ne sera pas nécessaire d'effectuer des examens à 3 mois, chez les rongeurs comme chez les autres animaux, si aucun effet sur les paramètres hématologiques n'a été observé lors d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables. Les échantillons de sang sont prélevés en un point déterminé, par exemple par ponction cardiaque ou au niveau du sinus rétro-orbitaire, sous anesthésie.

41. Les investigations portent sur les paramètres suivants (30): numération leucocytaire totale et différentielle, numération érythrocytaire et plaquettaire, concentration d'hémoglobine, hématocrite (volume cellulaire sanguin après centrifugation), volume corpusculaire moyen (VCM), hémoglobine corpusculaire moyenne (HCM), concentration d'hémoglobine corpusculaire moyenne (CHCM), temps de prothrombine et temps de thromboplastine partielle activée. D'autres paramètres hématologiques tels que les corps de Heinz et autres anomalies morphologiques érythrocytaires ou la méthémoglobine peuvent être étudiés si nécessaire en fonction de la toxicité de la substance d'essai. Dans l'ensemble, il convient d'adapter l'approche suivie à l'effet observé et/ou attendu d'une substance d'essai donnée. Si la substance d'essai exerce un effet sur le système hématopoïétique, des numérations réticulocytaires et une cytologie médullaire peuvent également être indiquées mais n'ont pas à être pratiquées de manière systématique.

42. Des analyses de biochimie clinique visant à étudier les principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur le rein et le foie, sont effectuées à partir d'échantillons de sang prélevés sur au moins 10 mâles et 10 femelles de chaque groupe, à des intervalles de temps semblables à ceux spécifiés pour les examens hématologiques, et en utilisant les mêmes animaux tout au long de l'étude. Si des souris sont utilisées, il peut être nécessaire de constituer des groupes satellites afin de pouvoir effectuer toutes les analyses de biochimie clinique nécessaires. Dans les études faisant intervenir des non-rongeurs, les échantillons seront prélevés sur un plus petit nombre d'animaux (par exemple, 4 animaux de chaque sexe par groupe dans les études chez le chien) à des stades intermédiaires et à la fin de l'étude, de la même manière que chez les rongeurs. Il ne sera pas nécessaire d'effectuer des examens à 3 mois, chez les rongeurs comme chez les autres animaux, si aucun effet sur les paramètres de biochimie clinique n'a été observé lors d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables. Il est recommandé de faire jeûner les animaux (à l'exception des souris) pendant la nuit qui précède la prise de sang. Les investigations portent sur les paramètres suivants (30): glucose, urée (azote uréique), créatinine, protéines totales, albumine, calcium, sodium, potassium, cholestérol total, au moins deux enzymes révélatrices des effets hépatocellulaires (alanine aminotransférase, aspartate aminotransférase, glutamate déshydrogénase, acides biliaires totaux) (31) et au moins deux enzymes révélatrices des effets hépatobiliaires (phosphatase alcaline, gamma-glutamyl transférase, 5'- nucléotidase, bilirubine totale, acides biliaires totaux) (31). D'autres paramètres de chimie clinique, tels que les triglycérides à jeun, des hormones spécifiques et la cholinestérase peuvent être mesurés si nécessaire en fonction en fonction de la toxicité de la substance d'essai. Dans l'ensemble, il convient d'adapter l'approche suivie à l'effet observé et/ou attendu d'une substance d'essai donnée.

▼M4

43. Des analyses d'urine sont effectuées à partir d'échantillons prélevés sur au moins 10 mâles et 10 femelles de chaque groupe, à des intervalles de temps semblables à ceux spécifiés pour les examens hématologiques et de chimie clinique. Il ne sera pas nécessaire d'effectuer des dosages à 3 mois si les analyses d'urine pratiquées dans le cadre d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables n'ont révélé aucun effet. La liste suivante de paramètres à étudier fait partie d'une recommandation d'experts relative aux études de pathologie clinique (30): aspect, volume, osmolalité ou poids spécifique, pH, protéines totales et glucose. D'autres mesures, notamment la recherche de corps cétoniques, d'urobilinogène, de bilirubine et de sang occulte, peuvent aussi être réalisées. L'étude d'autres paramètres peut aussi s'avérer nécessaire pour élargir les recherches sur l'effet ou les effets observés.

44. On considère généralement que dans les études portant sur des chiens, il convient de déterminer les variables hématologiques et de biochimie clinique de base avant le début du traitement, mais que ce n'est pas indispensable dans les études portant sur des rongeurs (30). Toutefois, si l'on ne dispose pas de données historiques de base appropriées (voir paragraphe 50), il convient d'envisager d'en obtenir

Pathologie

Autopsie macroscopique

45. Tous les animaux de l'étude font normalement l'objet d'une autopsie macroscopique complète et détaillée, comprenant un examen attentif de la surface externe du corps et de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Toutefois, des dispositions peuvent aussi être prises (dans les groupes d'animaux sacrifiés en cours d'étude ou les groupes satellites) pour limiter ces observations à des mesures essentielles telles que la neurotoxicité ou l'immunotoxicité (voir paragraphe 19). Il n'est pas nécessaire que ces animaux fassent l'objet d'une autopsie, ni des procédures ultérieures décrites dans les paragraphes qui suivent. L'autopsie des animaux sentinelles peut devoir être effectuée au cas par cas, à la discrétion du directeur d'étude.

46. Il convient de déterminer le poids des organes de tous les animaux hormis ceux mentionnés dans la dernière partie du paragraphe 45. Les glandes surrénales, le cerveau, les épididymes, le cœur, les reins, le foie, les ovaires, la rate, les testicules, la thyroïde (pesée après fixation, avec les glandes parathyroïdes) et l'utérus de tous les animaux (excepté ceux trouvés moribonds et/ou ayant été sacrifiés en cours d'étude) sont débarrassés, le cas échéant, de tout tissu adhérent et pesés à l'état frais dès que possible après la dissection, pour prévenir la dessiccation. Dans les études chez la souris, la pesée des glandes surrénales est facultative.

47. Les tissus suivants sont conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu (32) (l'examen des tissus indiqués entre crochets est facultatif):

toutes les lésions macroscopiques	ganglions lymphatiques (superficiels et profonds)	muscle squelettique	rein
aorte	glande coagulante	nerf périphérique	[sternum]
[bulbe olfactif]	glande de Harder	[voies respiratoires supérieures dont nez, cornets et sinus paranasaux]	testicule
cæcum	glande lacrymale (exorbitale)	œil (dont rétine)	thymus
cerveau (y compris segments d'encéphale, de cervelet et de bulbe rachidien/pont)	glande mammaire (obligatoire pour les femelles et, si visible à la dissection, aussi pour les mâles)	œsophage	thyroïde
cœur	glande salivaire	ovaire	trachée

▼**M4**

col utérin	glande surrénale	pancréas	[uretère]
côlon	hypophyse	parathyroïde	[urètre]
[dents]	iléon	peau	utérus (col inclus)
duodénum	jéjunum	poumon	vagin
épididyme	[langue]	prostate	vésicule biliaire (pour les espèces autres que le rat)
estomac (pré-estomac, estomac glandulaire)	moelle épinière (niveaux cervical, mésothoracique et lombaire)	rate	vésicule séminale
[fémur avec articulation]	segment de moelle osseuse et/ou moelle osseuse fraîchement ponctionnée	rectum	vessie
foie			

Dans le cas des organes allant par paires, par exemple les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont préservés. Les observations, notamment cliniques, peuvent amener à examiner d'autres tissus. Tous les organes considérés comme des organes cibles potentiels du fait des propriétés connues de la substance d'essai sont aussi conservés. Dans les études portant sur une administration par la voie cutanée, il y a lieu de conserver les organes figurant sur la liste établie pour la voie orale, et de procéder à un prélèvement et une conservation spécifiques de la peau provenant du site d'application. Pour les études par inhalation, la liste des tissus des voies respiratoires conservés et examinés est conforme aux recommandations des chapitres B.8 (8) et B.29 (9) de la présente annexe. Pour les autres organes et tissus (outre les tissus de l'appareil respiratoire spécifiquement conservés), il convient d'examiner les organes de la liste établie pour la voie orale.

Histopathologie

48. Des informations sont disponibles sur les meilleures pratiques en matière de conduite des études de pathologie toxicologique (32). Au minimum, les examens histopathologiques devront porter sur les tissus suivants:

— tous les tissus prélevés dans le groupe à dose élevée et le groupe témoin,

— tous les tissus prélevés sur les animaux morts ou sacrifiés au cours de l'étude,

— tous les tissus présentant des anomalies macroscopiques,

— tissus des organes cibles, ou tissus présentant des altérations dues au traitement dans le groupe à dose élevée, prélevés sur tous les animaux de tous les autres groupes de doses,

— dans le cas des organes allant par paires, comme les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont examinés.

▼M4

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

49. Des données sont recueillies pour chaque animal sur tous les paramètres évalués. En outre, toutes les données sont résumées sous forme de tableaux synoptiques indiquant, pour chaque groupe expérimental, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, le moment de la mort ou du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, la description des signes de toxicité observés, ainsi que le moment de l'apparition, la durée et la gravité de tous les effets toxiques observés, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion. Les tableaux récapitulatifs présentent les moyennes et les écarts types (pour les données recueillies en continu) pour les animaux présentant des effets toxiques ou des lésions, ainsi qu'une cotation des lésions.

50. Les données de contrôle historiques peuvent faciliter l'interprétation des résultats de l'étude, par exemple lorsque les données provenant des témoins concurrents semblent diverger de manière significative de données récentes obtenues sur des animaux témoins issus de la même installation d'essai/colonie d'élevage. Si elles sont évaluées, les données de contrôle historiques émanent du même laboratoire et porter sur des animaux du même âge et de la même souche, produits dans les cinq ans précédant l'étude en question.

51. Si possible, les résultats numériques devront être évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Les méthodes statistiques et les données à analyser sont choisies au moment de la conception de l'étude (paragraphe 8). Ce choix permet d'opérer des ajustements en fonction de la survie, si nécessaire.

Rapport d'essai

52. Le rapport d'essai mentionne les informations suivantes:

Substance d'essai:

— état physique, pureté et propriétés physico-chimiques,

— données d'identification,

— provenance de la substance d'essai,

— numéro de lot,

— certificat d'analyse chimique.

Véhicule (le cas échéant):

— justification du choix de véhicule (s'il est autre que l'eau).

Animaux d'expérience:

— espèce/souche utilisée et justification du choix opéré,

— nombre, âge et sexe des animaux au début de l'essai,

▼M4

— provenance, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,

— poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions expérimentales:

— justification de la voie d'administration et du choix des doses,

— le cas échéant, méthodes statistiques utilisées pour analyser les données,

— détails concernant la formulation de la substance d'essai ou son incorporation dans les aliments,

— données analytiques sur la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation,

— voie d'administration et détails concernant l'administration de la substance d'essai,

— pour les études par inhalation, mention de la voie d'entrée (nez seul ou corps entier),

— doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et, le cas échéant, facteur de conversion en dose réelle de la concentration de la substance d'essai (en mg/kg ou en ppm) dans les aliments ou l'eau de boisson,

— détails concernant la qualité de l'alimentation et de l'eau de boisson.

Résultats (les résultats comprendront des données générales sous forme de tableaux synoptiques et des données propres à chaque animal):

— données sur la survie,

— poids corporel/variations du poids corporel,

— prise d'aliments, calculs de l'efficacité alimentaire, si effectués, et prise d'eau, le cas échéant,

— réponse toxique par sexe et dose, y compris signes de toxicité,

— nature, incidence (et, si elle est évaluée, sévérité), et durée des observations cliniques (transitoires ou permanentes),

— examen ophtalmologique,

— examens hématologiques,

— épreuves de biochimie clinique,

— examens d'urine,

— résultats des recherches de neurotoxicité ou d'immunotoxicité,

— poids corporel à l'issue de l'essai,

— poids des organes (et leur rapport au poids corporel, le cas échéant),

— résultats d'autopsie,

— description détaillée de tous les résultats histopathologiques liés au traitement,

— données relatives à l'absorption, le cas échéant.

▼**M4**

Traitement statistique des résultats, le cas échéant

Discussion des résultats, notamment:

— relations dose-réponse,

— examen de toutes les informations concernant le mode d'action,

— examen de toutes les approches de modélisation,

— détermination des DR, DSENO et DMENO (dose minimale avec effet nocif observé),

— données de contrôle historiques,

— applicabilité des résultats à l'être humain.

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE:

(1) OCDE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), document de travail interne, direction de l'environnement, OCDE, Paris.

(2) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

(3) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal- based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145-191.

(4) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206, 437-445.

(5) Chapitre B.27 de la présente annexe, Toxicité orale subchronique, Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours.

(6) OCDE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 et 453 – Second edition. Série sur les essais et évaluations n° 116, disponible sur le site public de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (www.oecd.org/env/testguidelines).

(7) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Série sur les essais et évaluations n° 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(8) Chapitre B.8 de la présente annexe, Toxicité subaiguë par inhalation: étude sur 28 jours.

(9) Chapitre B.29 de la présente annexe, Toxicité subchronique par inhalation: étude sur 90 jours.

(10) Chapitre B.9 de la présente annexe, Toxicité cutanée à doses répétées – étude sur 28 jours.

(11) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

(12) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(13) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

▼**M4**

(14) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al*. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

(15) OCDE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(16) OCDE (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(17) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 - 837.

(18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(19) Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (JO L 276 du 20.10.2010, p. 33).

(20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, DC, US. Dept. of Health and Human Services.

(21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(23) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

(24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(25) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(26) Gad S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

(27) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(28) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

(29) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

▼**M4**

(30) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(31) EMEA (draft) document «Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity» (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(32) Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Appendice 1

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼B

B.31. ÉTUDE DE LA TOXICITÉ POUR LE DÉVELOPPEMENT PRÉNATAL

1. MÉTHODE

Cette méthode est calquée sur la ligne directrice d'essai n° 414 (2001) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode d'essai relative à la toxicité pour le développement est destinée à livrer des informations générales concernant les effets d'une exposition prénatale sur la femelle gravide et sur l'organisme en développement qu'elle porte en elle; cela recouvre notamment l'évaluation des effets sur la mère, ainsi que la mortalité fœtale, les anomalies structurelles ou les altérations de croissance du fœtus. Les déficits fonctionnels, qui représentent pourtant un aspect important du développement, ne sont pas étudiés dans le cadre de la présente méthode d'essai. Ces déficits peuvent être étudiés séparément ou en complément à la présente méthode dans le cadre de la méthode d'essai relative à la neurotoxicité pour le développement. Cette dernière méthode ainsi que la méthode relative à la toxicité pour la reproduction sur deux générations indiquent comment dépister les déficits fonctionnels et d'autres effets postnataux.

Il est possible que la présente méthode d'essai nécessite certaines adaptations dans des cas particuliers, compte tenu, par exemple, des propriétés physico-chimiques ou toxicologiques spécifiques de la substance d'essai. Ces adaptations sont acceptables lorsque des données scientifiques convaincantes donnent à penser qu'elles rendront l'essai plus informant. Le cas échéant, ces données scientifiques devront être soigneusement consignées dans le rapport d'essai.

1.2 DÉFINITIONS

Toxicologie du développement: l'étude des effets nocifs sur un organisme en développement, qui peuvent résulter d'une exposition antérieure à la conception, contemporaine au développement prénatal ou postnatale, jusqu'à la maturation sexuelle. La toxicité pour le développement se manifeste principalement par 1) la mort de l'organisme; 2) une anomalie structurelle; 3) une altération de croissance; 4) un déficit fonctionnel. Autrefois, la toxicologie du développement était souvent dénommée «tératologie».

Effet nocif: toute altération liée au traitement par rapport à une situation de référence, qui diminue la capacité d'un organisme à survivre, se reproduire ou s'adapter à l'environnement. La toxicologie du développement, prise dans son sens le plus large, inclut tous les effets qui interfèrent avec le développement normal du produit de conception, avant et après la naissance.

Altération de croissance: une altération qui touche les organes ou le poids corporel ou la taille de la progéniture.

Altérations (anomalies): altérations structurelles du développement qui comprennent les malformations et les variations (28).

Malformation/Anomalie majeure: changement structurel considéré comme préjudiciable à l'animal (peut aussi être létal) et généralement rare.

▼B

Variation/Anomalie mineure: changement structurel considéré comme peu ou pas préjudiciable à pour l'animal; peut être transitoire et peut survenir fréquemment dans la population témoin.

Produit de conception: l'ensemble des produits de la fécondation d'un œuf, à n'importe quel stade du développement entre la fécondation et la naissance, comprenant les membranes extra-embryonnaires et l'embryon ou le fœtus.

Implantation (nidation): la fixation du blastocyste à la muqueuse épithéliale de l'utérus, y compris la pénétration du blastocyste dans l'épithélium utérin et la nidation dans l'endomètre.

Embryon: le premier stade de développement d'un organisme, plus précisément la phase de développement d'un œuf fécondé qui commence après l'apparition du grand axe et s'achève quand toutes les structures principales sont présentes.

Embryotoxicité: nocivité pour la structure, le développement, la croissance et/ou la viabilité d'un embryon.

Fœtus: produit de conception, durant la période post-embryonnaire.

Fœtotoxicité: nocivité pour la structure, le développement, la croissance et/ou la viabilité d'un fœtus.

Avortement: expulsion prématurée hors de l'utérus des produits de conception: embryon ou fœtus non viable.

Résorption: phénomène par lequel un produit de conception qui meurt après l'implantation se résorbe ou a été résorbé.

Résorption précoce: trace d'implantation non accompagnée d'un embryon ou d'un fœtus reconnaissable.

Résorption tardive: embryon ou fœtus mort qui présente des changements dégénératifs externes.

DSET: dose sans effet toxique (correspond à la NOAEL: No Observed Adverse Effect Level)

1.3. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Aucune

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Normalement, la substance d'essai est administrée aux femelles gravides, au moins à partir de la nidation et jusqu'à la veille du sacrifice, lequel devrait être programmé à une date aussi proche que possible du jour probable de mise bas, sans être trop tardif pour éviter la perte de données en cas de mise bas prématurée. La méthode d'essai ne porte pas uniquement sur la période de l'organogenèse (comprise, par exemple entre le 5ème et le 15^{e} jour chez les rongeurs et entre le 6^{e} et le 18^{e} jour chez le lapin), mais étudie aussi les effets survenus tout au long de la gestation, depuis le stade pré-implantatoire, selon les besoins, jusqu'à la veille de la césarienne. Les femelles sont sacrifiées peu avant la césarienne, le contenu utérin est examiné et les fœtus étudiés pour détecter les anomalies externes visibles ainsi que les modifications des tissus mous et du squelette.

▼B

1.5. DESCRIPTION DE LÀ MÉTHODE D'ESSAI

1.5.1. **Choix de l'espèce animale**

Il est recommandé de pratiquer l'essai sur l'espèce la plus appropriée et d'employer les espèces et les souches de laboratoire couramment utilisées dans les essais de toxicité prénatale pour le développement. L'espèce de rongeur préféré est le rat et l'espèce non-rongeur préféré est le lapin. Le cas échéant, l'emploi d'une autre espèce doit être justifié.

1.5.2. **Conditions d'encagement et d'alimentation**

L'animalerie doit être à 22 °C (± 3°) pour les rongeurs et à 18 °C (± 3°) pour les lapins, avec un taux d'humidité relative d'au moins 30 % et de préférence inférieur à 70 % sauf durant le nettoyage de la salle, l'idéal se situant entre 50 et 60 %. On appliquera un éclairage artificiel, avec un cycle de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité. Un régime alimentaire classique pour animaux de laboratoire, avec eau potable à satiété, conviendra.

L'accouplement doit se dérouler dans des cages appropriées. Bien qu'il soit préférable de placer les animaux s'étant accouplés dans des cages individuelles, l'encagement par petits groupes est aussi acceptable.

1.5.3 **Préparation des animaux**

Il convient d'utiliser des animaux sains, acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours et n'ayant pas été soumis à d'autres essais. On indiquera l'espèce, la souche, la source, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience. Les animaux de tous les groupes d'essai devraient, dans toute la mesure du possible, être du même âge et du même poids. On emploiera de jeunes femelles adultes et nullipares pour chaque dose. On accouplera les femelles avec des mâles de la même espèce et de la même souche, sans accoupler les membres d'une même fratrie. Dans le cas des rongeurs, le jour 0 de la gestation est celui où l'on observe un bouchon vaginal et/ou la présence de sperme; s'agissant des lapins, le jour 0 est ordinairement celui du coït ou de l'insémination artificielle si cette technique est utilisée. Les femelles accouplées seront réparties au hasard entre groupes traités et groupes témoins. On installera les cages de façon à réduire au minimum les éventuels effets liés à leur emplacement. Chaque animal sera désigné par un numéro d'identification propre. En cas d'accouplement par lots, les animaux d'un même lot seront répartis uniformément entre les groupes. De la même façon, les femelles inséminées par un même mâle seront réparties uniformément entre les groupes.

1.6 MODE OPÉRATOIRE

1.6.1 **Nombre et sexe des animaux**

Chaque groupe traité et témoin doit contenir un nombre de femelles suffisant pour qu'une autopsie puisse être pratiquée sur environ 20 femelles présentant un point d'implantation. Des groupes comptant moins de 16 femelles présentant un point d'implantation risquent d'être inadéquats. La mortalité maternelle n'invalide pas nécessairement l'étude, tant qu'elle demeure inférieure à 10 pour cent environ.

▼B

1.6.2 **Préparation des doses**

Si on emploie un véhicule ou un autre additif pour faciliter l'administration des doses, il convient d'être attentif aux effets sur l'absorption, la distribution, le métabolisme et la rétention ou l'excrétion de la substance d'essai, aux effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai, lesquels sont susceptibles de modifier sa toxicité ainsi qu'aux effets sur la consommation de nourriture ou d'eau et sur l'état nutritionnel des animaux. Le véhicule ne doit pas être toxique pour le développement ni influer sur la reproduction.

1.6.3 **Dosage**

Normalement, la substance d'essai est administrée quotidiennement depuis la nidation (par exemple 5 jours après l'accouplement) jusqu'à la veille du jour où la césarienne est prévue. Si des études préliminaires, le cas échéant, ne font pas état d'un risque élevé de pertes pré-implantatoires, il est possible d'administrer le traitement pendant toute la durée de la gestation, depuis l'accouplement jusqu'à la veille de la césarienne. Nul n'ignore que le stress ou des erreurs de manipulation pendant la gestation peuvent engendrer des pertes prénatales. Afin de prévenir des pertes fœtales non liées au traitement, on évitera de manipuler inutilement les femelles gravides ou de les soumettre à des facteurs de stress externes comme le bruit.

On utilise au moins trois doses différentes et un groupe témoin en parallèle. Des animaux sains sont répartis au hasard entre les groupes traités et témoins. Les doses doivent être espacées de façon à produire une gradation des effets toxiques. Sauf limitations imposées par les propriétés physiques, chimiques ou biologiques de la substance d'essai, la dose la plus élevée devrait avoir une certaine toxicité pour le développement et/ou la mère (signes cliniques ou diminution du poids corporel), sans entraîner la mort ni provoquer des souffrances importantes. Au moins une dose intermédiaire devrait donner lieu à la plus faible manifestation observable de toxicité. La dose la plus faible ne devrait produire aucun signe de toxicité pour la mère ou pour le développement. Il convient de choisir une série décroissante doses afin de mettre en évidence une éventuelle relation dose-effet et une concentration maximale sans effet nocif observé (DSET). L'écart optimal entre les doses d'une série décroissante est généralement d'un facteur deux ou quatre et l'adjonction d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation d'écarts trop importants (par exemple, supérieurs à un facteur dix). Bien que le but soit d'établir une DSET maternelle, les études qui n'aboutissent pas à la détermination de cette valeur sont également acceptables (1).

Les doses doivent être choisies en tenant compte de toutes les données de toxicité disponibles ainsi que des informations complémentaires sur le métabolisme et la toxicocinétique de la substance d'essai ou de substances apparentées. Ces informations seront aussi utiles pour justifier l'échelle des doses.

On incorporera un groupe témoin en parallèle. La substance d'essai n'est pas administrée à ce groupe qui n'est traité que par le véhicule, le cas échéant. Tous les groupes doivent recevoir le même volume de substance d'essai ou de véhicule. Les animaux du ou des groupes témoins seront manipulés de la même façon que les animaux du groupe d'essai. Les groupes témoins auxquels on administre le véhicule doivent recevoir la plus grande quantité utilisée de ce dernier (celle que reçoit le groupe traité à la dose la plus faible).

▼B

1.6.4 **Essai limite**

Si un essai réalisé à une dose d'au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, administrée par voie orale, selon la méthode décrite dans cette étude, n'entraîne aucune toxicité apparente chez les femelles gravides ou dans leur progéniture, et qu'aucun effet n'est escompté au vu des données disponibles (concernant, par exemple, des composés présentant une structure et/ou une action métabolique analogues) il n'est pas indispensable de mener une étude complète sur trois doses différentes. Suivant le niveau d'exposition humaine prévu, il peut être nécessaire d'appliquer une dose orale plus élevée dans l'essai limite. Pour d'autres modes d'administration, tels que l'inhalation ou l'application cutanée, ce sont souvent les propriétés physicochimiques de la substance d'essai qui définissent et limitent le niveau maximal d'exposition pouvant être atteint (par exemple, l'application cutanée ne doit faire apparaître aucune toxicité locale grave).

1.6.5 **Administration des doses**

La substance d'essai ou le véhicule sont habituellement administrés oralement par intubation. Si l'expérimentateur opte pour un autre mode d'administration, il devra motiver sa décision et justifier son choix, et procéder aux modifications nécessaires (2) (3) (4). La substance d'essai doit être administrée à peu près à la même heure chaque jour.

Normalement, on calcule la dose destinée à chaque animal d'après la pesée la plus récente de ce dernier. Il convient toutefois d'être prudent lorsqu'on adapte la dose au cours du dernier tiers de la gestation. On s'appuiera sur les données existantes pour sélectionner la dose de façon à prévenir un excès de toxicité pour la mère. Néanmoins, si on constate une toxicité excessive chez les mères traitées, il faudra les euthanasier. Si plusieurs femelles gravides manifestent des signes de toxicité excessive, on envisagera de sacrifier le groupe traité à cette dose. Si on recourt au gavage, il faudrait de préférence administrer la substance en une seule fois à l'aide d'une sonde gastrique ou d'une canule appropriée. Le volume maximal de liquide administrable en une seule fois dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne devrait pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas des solutions aqueuses où l'on peut aller jusqu'à 2 ml/100 g de poids corporel. Lorsqu'on utilise de l'huile de maïs comme véhicule, le volume ne devrait pas excéder 0,4 ml/100 g de poids corporel. On réduira au minimum la variabilité du volume d'essai en adaptant les concentrations de façon à obtenir un volume constant à toutes les doses.

1.6.6 **Observation des mères**

Les observations cliniques sont effectuées et notées au moins une fois par jour, de préférence à la ou aux mêmes heures, en tenant compte de la période durant laquelle on prévoit que les effets atteindront leur intensité maximale. On consignera l'état des animaux, notamment, les animaux morts ou moribonds, les changements comportementaux pertinents et tous les signes de toxicité apparents.

1.6.7 **Poids corporel et consommation de nourriture**

Les animaux sont pesés au jour 0 de gestation ou au plus tard au jour 3 si des animaux déjà accouplés sont fournis par un éleveur extérieur, puis au premier jour de traitement et au moins tous les trois jours durant la période d'administration et enfin le jour du sacrifice.

▼B

Le relevé de la consommation d'aliments doit être effectué tous les trois jours et coïncider avec les jours de pesée des animaux.

1.6.8 **Autopsie**

On sacrifiera les femelles un jour avant la date prévue de mise bas. Les femelles qui présentent des signes d'avortement ou de mise bas prématurée avant la date prévue du sacrifice doivent être sacrifiées et faire l'objet d'un examen macroscopique complet.

Juste après le sacrifice ou la mort en cours de l'étude, les mères sont soumises à un examen macroscopique destiné à mettre en évidence d'éventuels changements pathologiques ou anomalies structurelles. Pour demeurer objectif, il est préférable que l'expérimentateur ignore la dose administrée au groupe lors de l'observation des mères au cours de la césarienne et de l'examen subséquent des fœtus.

1.6.9 **Examen du contenu utérin**

Il y a lieu d'enlever l'utérus juste après le sacrifice ou dès que possible après la mort pour s'assurer de l'état de gravidité des femelles. On examinera aussi les utérus apparemment non gravides (par exemple, par coloration au sulfure d'ammonium chez les rongeurs et par la coloration de Salewski ou par une méthode équivalente appropriée chez les lapins) pour confirmer la non-gravidité (5).

Les utérus gravides sont pesés, col inclus. Les poids des utérus gravides de femelles mortes en cours d'essai ne sont pas déterminés.

On compte le nombre de corps jaunes chez les femelles gravides.

Le contenu utérin est examiné afin de relever le nombre d'embryons ou de fœtus morts et le nombre de fœtus viables. Il est nécessaire de décrire le degré de résorption pour évaluer la date approximative de la mort du produit de conception (voir paragraphe 1.2).

1.6.10 **Examen des fœtus**

Il convient de déterminer le sexe et le poids corporel de chaque fœtus.

On recherche la présence d'altérations externes sur chaque fœtus.

On examine les fœtus pour voir s'ils présentent des altérations du squelette ou des tissus mous (par exemple des variations et des malformations ou des anomalies) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). La catégorisation des altérations fœtales est préférable, mais facultative. Si on procède à une catégorisation, il faut stipuler clairement les critères qui définissent chaque catégorie. On vérifiera avec une attention particulière si le développement du tractus génital n'a pas été altéré.

Pour les rongeurs, on prépare environ la moitié de chaque portée en vue de l'examen des altérations squelettiques. Le restant sera préparé en vue de l'examen des altérations des tissus mous, lequel sera conduit au moyen de coupes sériées réalisées suivant des méthodes reconnues ou appropriées ou de techniques soignées de dissection macroscopique.

▼B

S'agissant des non-rongeurs, par exemple les lapins, les éventuelles altérations des tissus mous et du squelette doivent être recherchées sur tous les fœtus. On examine les corps de ces fœtus en les disséquant soigneusement pour repérer des altérations des tissus mous; cette opération peut faire appel à une technique permettant d'effectuer un examen plus approfondi de la structure cardiaque interne (25). Les têtes de la moitié des fœtus examinés de cette manière doivent être prélevées et préparées en vue de l'évaluation des altérations des tissus mous (notamment les yeux, le cerveau, les conduits nasaux et la langue), selon des techniques classiques de coupes sériées (26) ou une méthode ayant la même sensibilité. Les corps de ces fœtus et ceux des fœtus intacts restants sont préparés puis examinés pour établir s'ils présentent des altérations squelettiques, à l'aide des mêmes méthodes que pour les rongeurs.

2. RÉSULTATS

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Les résultats sont consignés séparément pour chaque femelle et sa progéniture, et résumés sous forme de tableaux, reprenant pour chaque groupe d'essai et chaque génération, le nombre d'animaux présents au début de l'essai, le nombre d'animaux morts durant l'essai ou euthanasiés, la date de chaque mort ou euthanasie, le nombre de femelles gravides, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, la description des signes de toxicité observés, notamment le moment où ils ont débuté, leur durée et leur gravité, les types d'observations pratiquées sur les embryons ou fœtus et toutes les données pertinentes sur la portée.

On évaluera les résultats numériques par une méthode statistique appropriée, en prenant la portée comme unité pour l'analyse des résultats. Il convient d'utiliser une méthode statistique reconnue; le choix de la méthode doit intervenir au stade de la conception de l'étude et doit être justifié. Les résultats concernant les animaux qui n'ont pas survécu jusqu'à la date programmée du sacrifice doivent aussi être consignés. Ces résultats peuvent être inclus dans les moyennes des groupes, s'il y a lieu. La pertinence des résultats obtenus pour ces animaux et partant, la décision de les inclure ou non dans une moyenne de groupe, doit être appréciée au cas par cas.

2.2. ÉVALUATION DES RÉSULTATS

Les résultats de l'étude de toxicité pour le développement prénatal doivent être évalués du point de vue des effets observés. L'évaluation doit comprendre les informations suivantes:

— les résultats des essais maternels et fœtaux, incluant une évaluation de la relation, ou de l'absence de relation, entre l'exposition des animaux à la substance d'essai et la fréquence et la gravité de tous les effets observés,

— les critères appliqués pour catégoriser, le cas échéant, les altérations externes des fœtus, et les altérations de leurs tissus mous ou de leur squelette,

▼B

— selon les besoins, les données antérieures relatives aux témoins pour affiner l'interprétation des résultats de l'étude,

— les nombres utilisés pour calculer tous les pourcentages ou indices,

— l'analyse statistique appropriée des résultats de l'étude; il convient de fournir suffisamment d'informations sur la méthode d'analyse, pour qu'un réviseur ou un statisticien indépendant puisse réévaluer et reconstruire l'analyse.

Pour toute étude ne révélant aucun effet toxique, il y a lieu d'envisager des expériences complémentaires destinées à déterminer l'absorption et la biodisponibilité de la substance d'essai.

2.3. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Une étude de la toxicité pour le développement prénatal fournit des informations sur les effets de l'exposition répétée à une substance administrée durant la gestation sur les mères et sur le développement intra-utérin de leur progéniture. Les résultats de cette étude doivent être interprétés à la lumière de ceux des études de toxicité subchronique, de reproduction, des études toxicocinétiques et autres. Comme l'étude est centrée à la fois sur la toxicité générale du point de vue de la mère et sur la toxicité pour le développement, ses résultats permettront dans une certaine mesure de distinguer les effets sur le développement qui surviennent en l'absence d'une toxicité générale, des effets qui n'apparaissent qu'à des doses qui sont également toxiques pour la mère (27).

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit inclure les informations particulières énumérées ci-dessous:

Substance d'essai:

— état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques,

— identification, y compris le numéro du CAS s'il est connu,

— pureté.

Véhicule (le cas échéant):

— justification du choix du véhicule s'il diffère de l'eau.

Animaux d'expérience:

— espèce et souche utilisée,

— nombre et sexe des animaux,

— origine, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,

— poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions d'essai:

— justification du choix des doses appliquées,

— détails concernant la préparation de la substance d'essai ou son incorporation aux aliments, la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation,

▼B

— détails sur l'administration de la substance d'essai,

— conversion de la concentration de la substance d'essai (ppm) dans la nourriture ou l'eau de boisson en dose administrée (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu,

— conditions ambiantes,

— détails concernant la qualité de l'alimentation et de l'eau de boisson.

Résultats:

Données relatives à la toxicité pour la mère en fonction des doses, précisant entre autres:

— le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre de survivants, le nombre de femelles gravides, le nombre d'avortements et de mises bas prématurées,

— le jour de la mort si celle-ci est intervenue en cours d'essai et le nombre des animaux ayant survécu jusqu'au jour du sacrifice,

— les résultats concernant les animaux qui n'ont pas survécu jusqu'à la date du sacrifice doivent être consignés, mais non inclus dans les comparaisons statistiques entre les groupes,

— le jour de l'observation de chaque signe clinique anormal et son évolution ultérieure,

— le poids corporel, sa variation et le poids de l'utérus gravide, y compris, si on le souhaite, la variation du poids corporel corrigée en fonction du poids de l'utérus gravide,

— la consommation de nourriture, et d'eau si elle a été mesurée,

— les résultats de l'autopsie, y compris le poids de l'utérus,

— les valeurs de la DSET se rapportant aux effets sur la mère et sur le développement.

Données concernant les effets sur le développement en fonction des doses, pour les portées attestées par des implantations, notamment:

— nombre de corps jaunes,

— nombre d'implantations, nombre et pourcentage de fœtus vivants et morts et nombre de résorptions,

— nombre et pourcentage de pertes pré- et postimplantatoires.

Données concernant les effets sur le développement en fonction des doses, pour les portées comportant des fœtus vivants, notamment:

— nombre et pourcentage de descendants vivants,

— proportion de mâles et de femelles,

— poids corporel des fœtus, de préférence par sexe et pour les deux sexes confondus;

— malformations externes, des tissus mous et du squelette et autres altérations pertinentes,

— critères de catégorisation, le cas échéant,

▼B

— nombre total et pourcentage de fœtus et de portées présentant une quelconque altération externe, des tissus mous ou du squelette; types et fréquence des différentes anomalies et autres altérations pertinentes.

Discussion

Conclusions.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399-410.

(2) Kimmel, CA. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied* Toxicology 14; 386-398.

(3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CUT Activities* 17; 1-8.

(4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

(5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247:367.

(6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

(7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171-173.

(8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32: 381-391.

(9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47:229-242..

(10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.

(11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127:291-306.

(12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313-320.

(13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; :398-408.

(14) Kimmel, CA. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309-316.

(15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169-181.

▼B

(16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual,* pp. 163-173.

(17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411-445.

(18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61-63.

(19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313-355.

(20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181-188.

(21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton.* Thomas, Springfield, IL.

(22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques*, Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251-277.

(23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology,* Vol. 4. Plenum, NY.

(24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233-239.

(25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37-38.

(26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126-144.

(27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798-63826.

(28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; 249-292.

▼M4

B.32. ÉTUDES DE CANCÉROGENÈSE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 451 (2009) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La ligne directrice 451 initiale sur les études de cancérogenèse a été adoptée en 1981. Sa révision a été jugée nécessaire afin de tenir compte des évolutions récentes dans le domaine du bien-être animal, ainsi que des nouvelles exigences réglementaires (2) (3) (4) (5) (6). La mise à jour de la présente méthode d'essai B.32 a été effectuée en parallèle avec la révision des chapitres B.30 (études de toxicité chronique) et B.33 (études combinées de toxicité chronique et de cancérogenèse) de la présente annexe, dans le but d'obtenir des informations additionnelles à partir des animaux utilisés dans l'étude, et de fournir des précisions concernant le choix des doses. La présente méthode d'essai B.32 vise les essais portant sur une large gamme de produits chimiques, dont des pesticides et des produits chimiques industriels. Il convient toutefois de noter que certains aspects et certaines dispositions peuvent différer pour les produits pharmaceutiques (voir la Conférence internationale sur l'harmonisation, thème S1B: évaluation de la cancérogénicité des produits pharmaceutiques).

2. La plupart des études de cancérogenèse étant menées sur des espèces de rongeurs, la présente méthode d'essai est destinée à s'appliquer principalement à des études réalisées avec ces espèces. S'il s'avérait nécessaire de mener de telles études avec des non-rongeurs, il conviendrait d'appliquer, moyennant des modifications appropriées, les principes et procédures décrits dans la présente méthode d'essai et au chapitre B.27 – Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours – de la présente annexe (6). Des informations complémentaires peuvent aussi être trouvées dans le document d'orientation de l'OCDE n° 116 sur l'élaboration et la conduite des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (7).

3. Les trois principales voies d'administration utilisées dans les études de cancérogenèse sont la voie orale, la voie cutanée et l'inhalation. Le choix de la voie d'administration dépend des caractéristiques physiques et chimiques de la substance d'essai et de la voie d'exposition prédominante chez l'homme. Des informations complémentaires sur le choix de la voie d'exposition sont fournies dans le document d'orientation n° 116 (7).

4. La présente méthode d'essai porte principalement sur l'exposition par voie orale, la voie la plus communément utilisée dans les études de cancérogenèse. Bien que des études de cancérogenèse utilisant l'exposition par voie cutanée ou par inhalation puissent aussi être nécessaires pour évaluer le risque pour la santé humaine et/ou exigées en vertu de certains régimes réglementaires, ces deux voies d'exposition nécessitent des dispositifs techniques d'une grande complexité. De telles études devront être conçues au cas par cas, encore que la présente méthode d'essai, qui porte sur la caractérisation et l'évaluation de la cancérogénicité par voie orale, puisse fournir les bases d'un protocole d'étude par voie cutanée ou par inhalation, notamment en ce qui concerne les recommandations relatives aux durées de traitement, aux paramètres cliniques et pathologiques, etc. Il existe des documents d'orientation de l'OCDE sur l'administration expérimentale de substances d'essai par voie cutanée (7) et par inhalation (7) (8). Les chapitres B.8 (9) et B.29 (10) de la présente annexe, ainsi que le document d'orientation de l'OCDE sur l'essai de toxicité aiguë par inhalation (8), méritent tout particulièrement d'être consultés lors de la conception d'études à long terme portant sur une exposition par inhalation. Le chapitre B.9 de la présente annexe (11) doit être consulté dans le cas d'un essai portant sur la voie cutanée.

▼**M4**

5. L'étude de cancérogenèse donne des éléments d'information sur les risques pour la santé susceptibles de découler d'une exposition répétée pendant une période pouvant couvrir la vie entière de l'espèce considérée. L'étude fournit des informations sur les effets toxiques de la substance d'essai, y compris sur son pouvoir cancérogène, et peut indiquer les organes cibles et la possibilité d'accumulation dans ces organes. Elle peut aussi donner une estimation de la dose sans effet nocif observé pour ce qui est des effets toxiques et, dans le cas des substances cancérogènes non génotoxiques, des réponses tumorales. Cette estimation permet d'établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine. De plus, il convient d'accorder une attention particulière à l'observation clinique des animaux afin d'obtenir le plus d'informations possibles.

6. Les objectifs des études de cancérogenèse couvertes par la présente méthode d'essai sont les suivants:

— identification des propriétés cancérogènes d'une substance d'essai susceptibles d'augmenter les risques de néoplasmes, la fréquence de survenue de néoplasmes malins ou la diminution du temps nécessaire à leur apparition, par rapport aux groupes témoins concurrents,

— identification d'un ou de plusieurs organes cibles de la cancérogenèse,

— identification du temps d'apparition des néoplasmes,

— caractérisation de la relation entre la dose administrée et la réponse tumorale,

— identification du niveau de dose sans effet nocif observé (DSENO) ou du point de départ pour l'établissement d'une dose de référence (DR),

— extrapolation des effets cancérogènes aux niveaux d'exposition humaine correspondant à de faibles doses,

— obtention de données permettant de vérifier les hypothèses concernant le mode d'action (2) (7) (12) (13) (14) (15).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

7. Pour caractériser et évaluer la cancérogénicité potentielle d'un produit chimique, le laboratoire chargé de l'étude prend en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de réaliser l'étude, afin de pouvoir orienter celle-ci de manière à tester plus efficacement le potentiel cancérogène de la substance, et faire le moins possible appel aux animaux. La connaissance du mode d'action d'un agent cancérogène suspecté et sa prise en compte (2) (7) (12) (13) (14) (15) sont particulièrement importantes puisque la conception optimale de l'essai peut différer selon que la substance d'essai est ou n'est pas un agent cancérogène génotoxique connu ou suspecté. Des informations complémentaires sur certains aspects du mode d'action peuvent être trouvées dans le document d'orientation n° 116 (7).

8. Les informations utiles pour concevoir l'étude sont notamment: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les résultats de toutes les études de toxicité in vitro ou in vivo menées et notamment des essais de génotoxicité; l'utilisation (les utilisations) prévue(s) et le potentiel d'exposition humaine; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques (par exemple mutagénicité, génotoxicité et pouvoir cancérogène) relatives aux substances chimiques structurellement apparentées; les données toxicocinétiques disponibles (dose unique et doses répétées, si ces données existent) et les résultats d'autres études à doses répétées. La caractérisation du pouvoir cancérogène est effectuée après obtention des premiers résultats d'essais de toxicité à doses répétées

▼M4

menés sur 28 jours et/ou 90 jours. Les essais d'initiation-promotion de cancers à court terme peuvent aussi livrer des informations utiles. Il convient d'envisager l'adoption d'une approche par étapes pour l'étude expérimentale de la cancérogenèse entreprise dans le cadre de l'évaluation globale des effets nocifs potentiels d'une substance d'essai (16) (17) (18) (19).

9. Les méthodes statistiques les plus appropriées pour l'analyse des résultats, compte tenu du plan expérimental et des objectifs de l'étude, sont identifiées avant le début de l'étude. Il convient notamment de déterminer si les statistiques doivent prendre en compte l'ajustement en fonction de la survie, l'analyse des risques de tumeurs cumulées liés à la durée de survie, l'analyse du temps nécessaire à l'apparition d'une tumeur et l'analyse effectuée en cas de mort prématurée des animaux d'un ou de plusieurs groupes. On trouvera des indications concernant les analyses statistiques appropriées, ainsi que des références clés à des méthodes statistiques reconnues au plan international, dans le document d'orientation n° 116 (7), ainsi que dans le document d'orientation n° 35 sur l'analyse et l'évaluation des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (20).

10. Lors de la réalisation d'une étude de cancérogenèse, il est recommandé de toujours suivre les principes et considérations énoncés dans le document d'orientation n° 19 de l'OCDE sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques comme effets observés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité (21). Le paragraphe 62 de ce document, en particulier, stipule ce qui suit: «*Dans les études comportant l'administration de doses répétées, lorsqu'un animal présente des signes cliniques progressifs de détérioration de son état, une décision d'euthanasier ou non l'animal est prise en connaissance de cause. Cette décision met en balance des facteurs tels que la valeur des informations pouvant être obtenues en maintenant l'animal dans l'étude d'une part, et l'état général de celui-ci d'autre part. Si la décision est prise de poursuivre l'essai sur cet animal, la fréquence des observations est augmentée selon les besoins. Il est aussi possible, sans toutefois nuire à l'objectif de l'essai, d'interrompre l'administration de la substance d'essai pour soulager la douleur ou la détresse de l'animal, ou de réduire la dose testée.*»

11. On trouvera des informations détaillées et une discussion sur les principes déterminant le choix des doses pour les études de toxicité chronique et de cancérogenèse dans le document d'orientation n° 116 (7), ainsi que dans deux publications de l'Institut international des sciences de la vie (22) (23). La stratégie de base pour le choix des doses dépend du ou des principaux objectifs de l'étude (paragraphe 6). En choisissant des niveaux de doses appropriés, il convient de trouver un équilibre entre, d'une part, l'identification des dangers et, d'autre part, la caractérisation des réponses aux faibles doses et leur pertinence. Cet équilibre est particulièrement nécessaire dans le cas où une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (chapitre B.33 de la présente annexe) est menée (paragraphe 12).

12. Il convient d'examiner l'opportunité de réaliser une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (chapitre B.33 de la présente annexe) plutôt que de réaliser séparément une étude de toxicité chronique (chapitre B.30 de la présente annexe) et une étude de cancérogenèse (la présente méthode d'essai B.32). L'essai combiné permet une meilleure efficacité en temps et en coûts par rapport à la conduite de deux essais séparés, et ne compromet pas la qualité des données de la phase chronique ou de la phase de cancérogenèse. Lors de la réalisation d'une étude combinée (chapitre B.33 de la présente annexe), il convient toutefois de respecter les principes déterminant le choix de la dose (paragraphes 11 et 22 à 25) et il est également reconnu que certains cadres réglementaires peuvent imposer la conduite d'études séparées.

▼M4

13. Les définitions utilisées dans le contexte de la présente méthode d'essai figurent à la fin du présent chapitre et dans le document d'orientation n° 116 (7).

PRINCIPE DE L'ESSAI

14. La substance d'essai est administrée quotidiennement à différents groupes d'animaux, pendant la plus grande partie de leur vie, à des doses progressives et habituellement par la voie orale. Les essais par inhalation ou par la voie cutanée peuvent aussi être appropriés. Les animaux sont observés attentivement pendant la période d'administration afin de déceler d'éventuels signes de toxicité et le développement de lésions néoplasiques. Les animaux qui meurent ou sont sacrifiés en cours d'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont sacrifiés et autopsiés.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Choix des espèces animales

15. La présente méthode d'essai traite principalement de la caractérisation et de l'évaluation de la cancérogénicité chez les rongeurs (paragraphe 2). Le recours à des espèces autres que des rongeurs peut être envisagé si les données disponibles laissent escompter une meilleure prédiction des effets de la substance sur la santé humaine. Dans ce cas, le choix de l'espèce est justifié. L'espèce de rongeur préférée est le rat, mais d'autres rongeurs comme la souris peuvent être utilisés. Bien que le recours à la souris dans les études de cancérogenèse puisse ne présenter qu'un intérêt limité (24) (25) (26), certains programmes réglementaires actuels exigent tout de même la conduite d'essais de cancérogenèse sur la souris, sauf lorsqu'il est établi qu'une telle étude n'est pas nécessaire sur le plan scientifique. Les rats et les souris sont les modèles expérimentaux choisis de préférence, en raison de leur durée de vie relativement courte, de leur utilisation fréquente dans les études pharmacologiques et toxicologiques, de leur sensibilité à l'induction de tumeurs et de la disponibilité de souches suffisamment caractérisées. Ces caractéristiques permettent d'obtenir une grande quantité d'informations sur la physiologie et la pathologie de ces animaux. Des informations additionnelles sur le choix des espèces et des souches sont disponibles dans le document d'orientation n° 116 (7).

16. Il convient d'employer des animaux adultes sains, de souches communément utilisées dans les laboratoires. L'étude de cancérogenèse sera effectuée de préférence sur des animaux de même souche et de même provenance que ceux utilisés dans l'étude (les études) de toxicité préliminaire(s) de plus courte durée. Si toutefois ces animaux sont réputés ne pas répondre aux critères de survie généralement admis dans les études à long terme [voir le document d'orientation n° 116 (7)], il convient d'envisager d'utiliser une souche d'un animal dont le taux de survie permette de réaliser une étude à long terme. Les femelles sont nullipares et non gravides.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

17. Les animaux peuvent être logés individuellement ou réunis dans des cages en petits groupes du même sexe, l'hébergement individuel n'étant à envisager que dans des cas scientifiquement justifiés (27) (28) (29). Les cages sont placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats de l'étude soit réduite au minimum. La température du local des animaux d'expérience est de 22 °C (± 3 °C). L'humidité relative est d'au moins 30 % et n'excède pas de préférence 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit comprise entre 50 et 60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire peut être un régime classique de laboratoire

▼M4

avec eau potable à satiété. Il satisfait tous les besoins nutritionnels de l'espèce étudiée, et la teneur en contaminants alimentaires susceptibles d'influer sur les résultats de l'essai (résidus de pesticides, polluants organiques persistants, phyto-œstrogènes, métaux lourds et mycotoxines, par exemple) est aussi faible que possible. Des données analytiques sur les teneurs en nutriments et en contaminants alimentaires sont recueillies régulièrement, au moins au début de l'étude et lors des changements de lots; ces données figurent dans le rapport final. Des données analytiques sur l'eau de boisson utilisée lors de l'étude sont de même fournies. Le choix du régime alimentaire peut être influencé par la nécessité d'assurer un mélange convenable de la substance d'essai et de satisfaire les besoins nutritionnels des animaux lorsque la substance d'essai est administrée dans la nourriture.

Préparation des animaux

18. Il convient d'utiliser des animaux sains, acclimatés aux conditions de laboratoire depuis au moins 7 jours et n'ayant jamais été soumis auparavant à des protocoles expérimentaux. Dans le cas des rongeurs, l'administration de la substance commence dès que possible après le sevrage et l'acclimatation, et de préférence avant l'âge de 8 semaines. L'espèce, la souche, la provenance, le sexe, le poids et l'âge des animaux d'expérience sont précisés. Au début de l'étude, la variation de poids des animaux de chaque sexe est minimale et n'excède pas ± 20 % du poids moyen de tous les animaux étudiés, et ce pour chaque sexe séparément. Les animaux sont affectés de manière aléatoire aux différents groupes (témoins et traités). Après la randomisation, les poids moyens des groupes de chaque sexe ne présentent pas de différences significatives. En cas de différences statistiquement significatives, la phase de randomisation est répétée dans la mesure du possible. Chaque animal reçoit un numéro d'identification unique et en est marqué de manière permanente par tatouage, implant de micropuce ou toute autre méthode appropriée.

PROTOCOLE

Nombre et sexe des animaux

19. Il convient d'utiliser des animaux des deux sexes. Leur nombre est suffisant pour permettre une évaluation biologique et statistique complète. Chaque groupe de dose, de même que chaque groupe témoin correspondant, comprend au moins 50 animaux de chaque sexe. Selon le but de l'étude, il est possible d'augmenter la puissance statistique des principales estimations en répartissant les animaux de manière différenciée entre les groupes de doses, avec plus de 50 animaux dans les groupes à faibles doses pour estimer par exemple la cancérogénicité aux faibles doses. Il convient toutefois de noter qu'une augmentation modérée de la taille d'un groupe entraînera une augmentation relativement faible de la puissance statistique de l'étude. On trouvera des données complémentaires sur la conception statistique de l'étude, et sur le choix de niveaux de doses permettant d'optimiser la puissance statistique, dans le document d'orientation n° 116 (7).

Sacrifices en cours d'étude et groupes satellites (sentinelles)

20. L'étude peut prévoir le sacrifice d'animaux en cours d'étude, par exemple à 12 mois, afin de recueillir des données sur la progression des altérations néoplasiques et des données mécanistiques, si cela est scientifiquement justifié. Si l'on dispose déjà de ces données, obtenues antérieurement lors d'études de toxicité à doses répétées sur la substance d'essai, les sacrifices en cours d'étude peuvent ne pas être scientifiquement justifiés. S'ils sont néanmoins inclus dans l'étude, les groupes d'animaux traités destinés à être sacrifiés en cours d'étude comptent normalement 10 animaux de chaque sexe, et le nombre total d'animaux utilisés dans l'étude est augmenté du nombre d'animaux que l'on prévoit de sacrifier avant l'achèvement de l'étude. Un groupe supplémentaire d'animaux sentinelles (généralement 5 animaux de chaque sexe) peut être inclus si nécessaire pour le suivi de l'état pathologique au cours de l'étude (30). Des informations complémentaires figurent dans le document d'orientation n° 116 (7).

▼M4

Groupes de dose et dosage

21. Le document d'orientation n° 116 (7) donne des indications sur tous les aspects du choix des doses et des écarts entre les doses. Il convient d'utiliser au moins trois doses et un groupe témoin. Les niveaux de doses seront généralement basés sur les résultats d'études à plus court terme à doses répétées, ou d'études préliminaires de détermination des concentrations, et prennent en compte toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques existantes relatives à la substance d'essai ou aux substances chimiques apparentées.

22. À moins de contraintes dues à la nature physico-chimique ou aux effets biologiques de la substance d'essai, le niveau de dose le plus élevé est choisi de manière à permettre d'identifier les principaux organes cibles et les effets toxiques de la substance tout en évitant la souffrance, une toxicité sévère ou une forte morbidité ou létalité chez les animaux testés. Compte tenu des facteurs mentionnés au paragraphe 23 ci-dessous, la plus forte dose est normalement choisie pour provoquer une manifestation de toxicité, par exemple un ralentissement de la prise de poids corporel (d'environ 10 %). Toutefois, en fonction des objectifs de l'étude (voir paragraphe 6), on pourra choisir un niveau de dose maximal plus faible que la dose qui provoque des signes de toxicité, par exemple une dose entraînant un effet négatif préoccupant mais dont l'impact sur l'espérance de vie ou le poids corporel reste faible.

23. Les niveaux de doses et les intervalles entre les doses peuvent être choisis de manière à pouvoir établir une relation dose-réponse et, selon le mode d'action de la substance d'essai, une DSENO ou tout autre résultat escompté de l'étude, notamment une DR (voir paragraphe 25) au plus bas niveau de dose. Les facteurs à prendre en compte dans le choix des faibles doses sont notamment la pente attendue de la courbe dose-réponse, les doses qui provoquent des changements métaboliques importants ou qui modifient notablement le mode d'action toxique, le niveau auquel on peut prévoir un seuil, ou celui auquel on peut prévoir de fixer un point de départ pour une extrapolation aux faibles doses.

24. Les intervalles entre les doses dépendront des caractéristiques de la substance d'essai, et ne peuvent donc pas être prescrits dans la présente méthode d'essai, mais des intervalles correspondant à un facteur 2 ou 4 sont souvent les plus appropriés entre les doses décroissantes, et l'inclusion d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation de très grands intervalles (correspondant par exemple à un facteur de plus de 6 à 10) entre les doses. En général, les facteurs supérieurs à 10 sont évités, et leur utilisation est justifiée.

25. Comme le précise le document d'orientation n° 116 (7), les facteurs à prendre en compte dans le choix des doses sont notamment les suivants:

— non-linéarités ou points d'inflexion connus ou supposés de la courbe dose-réponse,

— toxicocinétique et gammes de doses auxquelles l'induction métabolique, la saturation ou la non-linéarité entre les doses internes et externes surviennent ou non,

— lésions précurseurs, marqueurs d'effets ou indicateurs du déroulement de processus biologiques clés sous-jacents,

— aspects principaux (ou présumés) du mode d'action, par exemple doses auxquelles une cytotoxicité commence à se manifester, les dosages hormonaux sont modifiés, les mécanismes homéostatiques sont dépassés, etc.,

▼M4

— régions de la courbe dose-réponse nécessitant une estimation particulièrement précise, par exemple dans le domaine de la DR prévue ou d'un seuil présumé,

— prise en compte des niveaux prévus d'exposition humaine.

26. Le groupe témoin sera un groupe non traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance d'essai, les animaux du groupe sont traités de la même manière que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé pour les groupes traités. Si la substance d'essai est incorporée aux aliments et entraîne une diminution sensible de la prise de nourriture liée à une moindre appétence de celle-ci, il pourra être utile d'utiliser un groupe témoin supplémentaire nourri en parallèle, qui constituerait un témoin plus approprié.

Préparation des doses et administration de la substance d'essai

27. La substance d'essai est normalement administrée par voie orale, soit dans la nourriture ou l'eau de boisson, soit par gavage. Des informations complémentaires sur les voies et méthodes d'administration figurent dans le document d'orientation n° 116 (7). La voie et le mode d'administration dépendent de la finalité de l'étude, des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai, de sa biodisponibilité ainsi que de la voie et du mode prédominants d'exposition humaine. Il convient de justifier le choix de la voie et du mode d'administration. Dans l'intérêt des animaux, le gavage oral n'est normalement choisi que pour les substances pour lesquelles cette voie et ce mode d'administration correspondent à une voie d'exposition potentielle raisonnable chez l'homme (produits pharmaceutiques, par exemple). Dans le cas des produits chimiques alimentaires ou environnementaux, notamment les pesticides, l'administration se fait d'ordinaire via le régime alimentaire ou l'eau de boisson. Toutefois, dans certains contextes, tels que l'exposition professionnelle, l'administration par d'autres voies peut être plus appropriée.

28. Si nécessaire, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Il convient de prendre en compte les caractéristiques suivantes du véhicule et des autres additifs, s'il y a lieu: effets sur l'absorption, la répartition, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité; et effets sur la consommation d'aliments ou d'eau, ou sur l'état nutritionnel des animaux. Il est recommandé, dans la mesure du possible, d'envisager en premier lieu une solution ou une suspension aqueuse, puis celle d'une solution ou d'une émulsion dans une huile (par exemple huile de maïs), et en dernier lieu celle d'une solution dans d'autres véhicules. Les caractéristiques de toxicité des véhicules autres que l'eau sont connues. Il convient de disposer de données sur la stabilité de la substance d'essai et sur l'homogénéité des solutions ou rations contenant les différentes doses (selon les cas) dans les conditions d'administration (nourriture, par exemple).

29. Il importe de veiller à ce que les quantités de substances administrées dans les aliments ou l'eau de boisson n'interfèrent pas avec la nutrition ou l'équilibre hydrique. Dans les études de toxicité à long terme faisant intervenir une administration par voie alimentaire, la concentration de la substance d'essai dans les aliments ne dépasse pas normalement 5 % de la ration totale, afin d'éviter les déséquilibres nutritionnels. Si la substance d'essai est incorporée à la nourriture, on peut utiliser soit une concentration alimentaire constante (mg/kg d'aliment ou ppm) soit un niveau de dose constant par rapport au poids corporel de l'animal (mg/kg de poids corporel), calculé sur une base hebdomadaire. La solution choisie est spécifiée.

▼M4

30. En cas d'administration par voie orale, les animaux reçoivent une dose quotidienne de la substance d'essai (à raison de 7 jours par semaine) et ce normalement pendant une période de 24 mois pour les rongeurs (voir aussi le paragraphe 32). Tout autre régime de dosage, par exemple une administration 5 jours par semaine, fait l'objet d'une justification. En cas d'administration par voie cutanée, les animaux reçoivent normalement le traitement pendant au moins 6 heures par jour, 7 jours par semaine, comme le spécifie le chapitre B.9 de la présente annexe (11), et ce pendant une période de 24 mois. L'exposition par inhalation est réalisée pendant 6 heures par jour, 7 jours par semaine, mais il est possible, si cela se justifie, de limiter l'exposition à 5 jours par semaine. La période d'exposition est normalement de 24 mois. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées «nez seul», il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Le choix d'une durée d'exposition inférieure à 6 heures par jour devra être justifié. Voir aussi à ce sujet le chapitre B.8 de la présente annexe (9).

31. Lorsque la substance d'essai est administrée aux animaux par gavage, l'opération est pratiquée aux mêmes moments de la journée au moyen d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Normalement, une dose unique sera administrée une fois par jour mais lorsque, par exemple, la substance chimique est un irritant local, il pourra être envisagé de maintenir la dose journalière en la fractionnant (deux fois par jour). Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal d'expérience. Le volume est maintenu aussi faible que possible et n'excède pas normalement 1 ml/100 g de poids corporel pour les rongeurs (31). Il convient de minimiser la variabilité du volume testé en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à tous les niveaux de doses. Les substances potentiellement corrosives ou irritantes sont l'exception et leur dilution permettra d'éviter tout effet local sévère. L'essai n'est donc pas mené à des concentrations susceptibles d'être corrosives ou irritantes pour le tube digestif.

Durée de l'étude

32. La durée de l'étude sera normalement de 24 mois pour les rongeurs, ce qui correspond à la majeure partie de la durée de vie normale des animaux utilisés. Elle pourra être allongée ou raccourcie selon la durée de vie de la souche de l'espèce animale utilisée, mais cette décision fait l'objet d'une justification. Pour certaines souches particulières de souris, par exemple AKR/J, C3H/J ou C57BL/6J, une durée de 18 mois peut être plus appropriée. On trouvera ci-après des informations sur la durée, la clôture de l'étude et la survie; d'autres considérations, relatives notamment à l'acceptabilité d'une étude de cancérogenèse estimée négative du fait de la survie des animaux, figurent dans le document d'orientation n° 116 (7).

— La clôture de l'étude est envisagée lorsque le nombre de survivants des groupes soumis aux plus faibles doses ou du groupe témoin tombe en dessous de 25 pour cent.

— La clôture de l'étude n'est pas déclenchée par la mort prématurée des animaux du seul groupe ayant reçu la dose la plus élevée.

— La survie des animaux est prise en considération séparément pour chaque sexe.

— L'étude n'est pas prolongée au-delà du point où les données pouvant être tirées de l'étude ne sont plus suffisantes pour permettre une évaluation statistiquement valable.

▼**M4**

OBSERVATIONS

33. Un examen de la morbidité ou de la mortalité est effectué quotidiennement chez tous les animaux, généralement en début et en fin de journée, fins de semaine et jours fériés compris. Une recherche de signes spécifiques significatifs sur le plan toxicologique devra aussi être effectuée une fois par jour en tenant compte du moment où l'on prévoit que les effets des différentes doses atteindront leur intensité maximale après administration par gavage. Une attention particulière est accordée au développement de tumeurs, et le moment d'apparition, la localisation, les dimensions, l'aspect et la progression de chaque tumeur nettement visible ou palpable sont consignés.

Poids corporel, consommation de nourriture et d'eau, et efficacité alimentaire

34. Tous les animaux sont pesés au début du traitement, au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. La consommation de nourriture et l'efficacité alimentaire sont aussi mesurées au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Lorsque la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la consommation d'eau est aussi mesurée au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Il peut également être utile de mesurer la consommation d'eau dans les études où la prise d'eau est modifiée.

Hématologie, biochimie clinique et autres mesures

35. Afin d'obtenir le plus possible d'informations de l'étude, surtout en ce qui concerne le mode d'action de la substance, il peut être utile d'effectuer des prélèvements sanguins afin de procéder à des analyses hématologiques et de biochimie clinique, mais la décision appartient au directeur de l'étude. Des analyses d'urine peuvent être aussi appropriées. On trouvera des informations complémentaires sur l'intérêt de tels prélèvements pour une étude de cancérogenèse dans le document d'orientation n° 116 (7). S'il y a lieu, des prélèvements sanguins en vue d'analyses hématologiques et de chimie clinique et des analyses d'urines peuvent être effectués dans le cadre de sacrifices réalisés en cours d'étude (paragraphe 20) et à la fin de l'étude sur un minimum de 10 animaux de chaque sexe par groupe. Les échantillons de sang sont prélevés en un point déterminé, par exemple par ponction cardiaque ou au niveau du sinus rétro-orbital sous anesthésie, et seront conservés si nécessaire dans des conditions appropriées. Des étalements sanguins peuvent aussi être préparés en vue d'un examen, notamment si la moelle osseuse semble être l'organe cible, bien que l'utilité d'un tel examen pour l'évaluation du potentiel cancérogène/oncogène ait été mise en question (32).

PATHOLOGIE

Autopsie macroscopique

36. Tous les animaux de l'étude à l'exception des sentinelles et autres animaux satellites (voir paragraphe 20) font l'objet d'une autopsie macroscopique complète et détaillée, comprenant un examen attentif de la surface externe du corps et de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leurs contenus. L'autopsie des sentinelles et autres animaux satellites peut devoir être effectuée au cas par cas, à la discrétion du directeur de l'étude. La pesée des organes ne fait normalement pas partie d'une étude de cancérogenèse car les changements liés à l'âge ou, dans des phases plus avancées, au développement de tumeurs rendent superflues les données relatives au poids des organes. Ces données peuvent toutefois présenter un grand intérêt pour les évaluations fondées sur le poids de la preuve, notamment en ce qui concerne le mode d'action. Si ces données font partie d'une étude satellite, elles ne sont pas collectées au-delà d'un an après le début de l'étude.

▼**M4**

37. Les tissus suivants sont conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu (33) (l'examen des tissus indiqués entre crochets est facultatif):

toutes les lésions macroscopiques	cœur	pancréas	estomac (pré-estomac, estomac glandulaire)
glande surrénale	iléon	glande parathyroïde	[dents]
aorte	jéjunum	nerf périphérique	testicule
cerveau (segments d'encéphale, de cervelet et de bulbe rachidien/pont)	rein	hypophyse	thymus
cæcum	glande lacrymale (exorbital)	prostate	thyroïde
col utérin	foie	rectum	[langue]
glande coagulante	poumon	glande salivaire	trachée
côlon	ganglions lymphatiques (superficiels et profonds)	vésicule séminale	vessie
duodénum	glande mammaire (obligatoire pour les femelles et, si visible à la dissection, aussi pour les mâles)	muscle squelettique	utérus (col inclus)
épididyme	[voies respiratoires supérieures dont nez, cornets et sinus paranasaux]	peau	[uretère]
œil (y compris rétine)	œsophage	moelle épinière (niveaux cervical, mésothoracique et lombaire)	[urètre]
[fémur avec articulation]	[bulbe olfactif]	rate	vagin
vésicule biliaire (pour les espèces autres que le rat)	ovaire	[sternum]	segment de moelle osseuse et/ou moelle osseuse fraîchement ponctionnée
glande de Harder			

Dans le cas des organes allant par paires, par exemple les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont préservés. Les observations, notamment cliniques, peuvent amener à examiner d'autres tissus. Tous les organes considérés comme des organes cibles potentiels du fait des propriétés connues de la substance d'essai sont aussi conservés. Dans les études portant sur une administration par la voie cutanée, il y a lieu de conserver les organes figurant sur la liste établie pour la voie orale, et de procéder à un prélèvement et une conservation spécifiques de la peau provenant du site d'application. Dans les études par inhalation, la liste des tissus des voies respiratoires conservés et examinés est conforme aux recommandations des chapitres B.8 et B.29 de la présente annexe. Pour les autres organes et tissus (outre les tissus des voies respiratoires spécifiquement conservés), il convient d'examiner les organes de la liste établie pour la voie orale.

▼M4

Histopathologie

38. Des informations sont disponibles sur les meilleures pratiques en matière de conduite des études de pathologie toxicologique (33). Au minimum, les examens devront porter sur les tissus suivants:

— tous les tissus prélevés dans le groupe à dose élevée et le groupe témoin,

— tous les tissus prélevés sur les animaux morts ou sacrifiés au cours de l'étude,

— tous les tissus présentant des anomalies macroscopiques, notamment des tumeurs,

— lorsque des altérations histopathologiques dues au traitement sont observées dans le groupe à dose élevée, ces mêmes tissus sont examinés chez tous les animaux de tous les autres groupes de doses,

— dans le cas des organes allant par paires, comme les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont examinés.

RÉSULTATS ET RAPPORTS

Données

39. Des données sont recueillies pour chaque animal sur tous les paramètres évalués. En outre, toutes les données sont résumées sous forme de tableaux synoptiques indiquant, pour chaque groupe expérimental, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, le moment de la mort ou du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, la description des signes de toxicité observés ainsi que le moment de l'apparition, la durée et la gravité de tous les effets toxiques observés, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion. Les tableaux synoptiques présentent les moyennes et les écarts-types (pour les données recueillies en continu) pour les animaux présentant des effets toxiques ou des lésions, ainsi qu'une cotation des lésions.

40. Les données de contrôle historiques peuvent faciliter l'interprétation des résultats de l'étude, par exemple lorsque les données provenant des témoins concurrents semblent diverger de manière significative de données récentes obtenues sur des animaux témoins issus de la même installation d'essai/colonie d'élevage. Si elles sont évaluées, les données de contrôle historiques émanent du même laboratoire et portent sur des animaux du même âge et de la même souche, produits dans les cinq ans précédant l'étude en question.

41. Si possible, les résultats numériques devront être évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Les méthodes statistiques et les données à analyser sont choisies au moment de la conception de l'étude (paragraphe 9). Ce choix permet d'opérer des ajustements en fonction de la survie, si nécessaire.

Rapport d'essai

42. Le rapport d'essai mentionne les informations suivantes:

Substance d'essai:

— état physique, pureté et propriétés physico-chimiques,

— données d'identification,

▼**M4**

— provenance de la substance chimique,

— numéro de lot,

— certificat d'analyse chimique.

Véhicule (le cas échéant):

— justification du choix du véhicule (s'il est autre que l'eau).

Animaux d'expérience:

— espèce/souche utilisée et justification du choix fait,

— nombre, âge et sexe des animaux au début de l'essai,

— provenance, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,

— poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions expérimentales:

— justification de la voie d'administration et du choix des doses,

— le cas échéant, méthodes statistiques utilisées pour analyser les données,

— détails concernant la formulation de la substance d'essai ou son incorporation dans les aliments,

— données analytiques sur la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation,

— voie d'administration et détails concernant l'administration de la substance d'essai,

— pour les études par inhalation, mention de la voie d'entrée (nez seul ou corps entier),

— doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et, le cas échéant, facteur de conversion en dose réelle de la concentration de la substance d'essai (en mg/kg ou en ppm) dans les aliments ou l'eau de boisson,

— détails concernant la qualité de l'alimentation et de l'eau de boisson.

Résultats (les résultats comprendront des données générales sous forme de tableaux synoptiques et des données propres à chaque animal)

Résultats généraux:

— données sur la survie,

— poids corporel/variations du poids corporel,

— prise d'aliments, calculs de l'efficacité alimentaire, si effectués, et prise d'eau, le cas échéant,

— données toxicocinétiques (si disponibles),

— ophtalmoscopie (si disponible),

— hématologie (si disponible),

— chimie clinique (si disponible).

▼**M4**

Résultats cliniques:

— signes de toxicité,

— incidence (et, si elle est évaluée, sévérité) de toute anomalie observée,

— nature, sévérité et durée des observations cliniques (transitoires ou permanentes).

Données relatives aux autopsies:

— poids corporel à l'issue de l'essai,

— poids des organes et leur rapport au poids corporel, le cas échéant,

— résultats d'autopsie; incidence et sévérité des anomalies.

Histopathologie:

— observations d'effets histopathologiques non néoplasiques,

— observations d'effets histopathologiques néoplasiques,

— corrélation entre les observations macroscopiques et microscopiques,

— description détaillée de tous les résultats histopathologiques liés au traitement et échelle d'évaluation de la sévérité,

— rapport sur l'analyse éventuelle des lames par des pairs.

Traitement statistique des résultats, le cas échéant

Discussion des résultats, notamment:

— examen de toutes les approches de modélisation,

— relations dose-réponse,

— données de contrôle historiques,

— examen de toutes les informations concernant le mode d'action,

— détermination des DR, DSENO et DMENO (dose minimale avec effet nocif observé),

— applicabilité des résultats à l'être humain;

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE:

(1) OCDE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OCDE, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

(4) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191.

(5) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

▼**M4**

(6) Chapitre B.27 de la présente annexe, Toxicité orale subchronique; Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours.

(7) OCDE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Série sur les essais et évaluations n° 116, disponible sur le site internet public de l'OCDE relatifs aux essais de produits chimiques (www.oecd.org/env/testguidelines).

(8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Série sur les essais et évaluations n° 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(9) Chapitre B.8 de la présente annexe – Toxicité subaiguë par inhalation: étude sur 28 jours.

(10) Chapitre B.29 de la présente annexe – Toxicité subchronique par inhalation: étude sur 90 jours.

(11) Chapitre B.9 de la présente annexe – Toxicité cutanée à doses répétées (28 jours).

(12) Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D., Farland W. (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.

(13) Cohen S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., and Fenner-Crisp P.A. (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

(14) Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L., Dragan Y.P. (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

(15) Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J., Patton D.E. (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

(16) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

(17) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(18) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

(19) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

(20) OCDE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Série sur les essais et évaluations n° 35 et série sur les pesticides n° 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OCDE, Paris.

(21) OCDE (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Série sur les essais et évaluations n° 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.

▼**M4**

(22) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths S.A., Parkinson C., McAuslane J.A.N. and Lumley C.E. (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

(25) Usui T., Griffiths S.A. and Lumley C.E. (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy P.O.F. & Harron D.W.G. (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.

(26) Carmichael N.G., Enzmann H., Pate I., Waechter F. (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105:1196-1203.

(27) Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (JO L 276 du 20.10.2010, p. 33).

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, DC, US Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

(32) Weingand K. *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(33) Crissman J., Goodman D., Hildebrandt P. *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Appendice 1

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼M4

B.33. ÉTUDES COMBINÉES DE TOXICITÉ CHRONIQUE ET DE CANCÉROGENÈSE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 453 (2009) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La ligne directrice 453 originale avait été adoptée en 1981. La présente méthode d'essai B.33 actualisée a été jugée nécessaire afin de tenir compte des évolutions récentes dans le domaine du bien- être animal, ainsi que des nouvelles exigences réglementaires (1) (2) (3) (4) (5). La mise à jour de la présente méthode d'essai B.33 a été effectuée en parallèle avec la révision des chapitres B.32 (Études de cancérogenèse) et B.30 (Études de toxicité chronique) de la présente annexe, dans le but d'obtenir des informations additionnelles à partir des animaux utilisés dans l'étude, et de fournir des précisions concernant le choix des doses. La présente méthode d'essai vise les essais portant sur une large gamme de produits chimiques, dont des pesticides et des produits chimiques industriels. Il convient toutefois de noter que certains aspects et certaines dispositions peuvent différer pour les produits pharmaceutiques (voir la Conférence internationale sur l'harmonisation, thème S1B: évaluation de la cancérogénicité des produits pharmaceutiques).

2. La plupart des études de toxicité chronique et de cancérogenèse étant menées sur des espèces de rongeurs, la présente méthode d'essai est destinée à s'appliquer principalement à des études réalisées avec ces espèces. S'il s'avérait nécessaire de mener de telles études avec des non-rongeurs, il conviendrait d'appliquer, moyennant des modifications appropriées, les principes et procédures décrits dans la présente méthode d'essai et dans le chapitre B.27 – Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours (6) de la présente annexe, comme indiqué dans le document d'orientation n° 116 de l'OCDE sur l'élaboration et la conduite des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (7).

3. Les trois principales voies d'administration utilisées dans les études de toxicité chronique et de cancérogenèse sont la voie orale, la voie cutanée et l'inhalation. Le choix de la voie d'administration dépend des caractéristiques physiques et chimiques de la substance d'essai et de la voie d'exposition prédominante chez l'homme. Des informations complémentaires sur le choix de la voie d'exposition sont fournies dans le document d'orientation n° 116 (7).

4. La présente méthode d'essai porte principalement sur l'exposition par voie orale, la voie la plus communément utilisée dans les études de toxicité chronique et de cancérogenèse. Bien que des études à long terme utilisant l'exposition par voie cutanée ou par inhalation puissent aussi être nécessaires pour évaluer le risque pour la santé humaine et/ou exigées en vertu de certains régimes réglementaires, ces deux voies d'exposition nécessitent des dispositifs techniques d'une grande complexité. De telles études devront être conçues au cas par cas, encore que la présente méthode d'essai, qui porte sur la caractérisation et l'évaluation de la toxicité chronique et de la cancérogénicité par voie orale, puisse fournir les bases d'un protocole d'étude par voie cutanée et/ou inhalation, notamment en ce qui concerne les recommandations relatives aux durées de traitement, aux paramètres cliniques et pathologiques, etc. Il existe des documents d'orientation de l'OCDE sur l'administration expérimentale de substances d'essai par inhalation (7) (8) et par voie cutanée (7). Les chapitres B.8 (9) et B.29 (10) de la présente annexe, ainsi que le document d'orientation de l'OCDE sur les essais de toxicité aiguë par inhalation (8), méritent tout particulièrement d'être consultés lors de la conception d'études à long terme portant sur une exposition par inhalation. Le chapitre B.9 de la présente annexe (11) doit être consulté dans le cas d'un essai portant sur la voie cutanée.

▼M4

5. L'étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse donne des éléments d'information sur les risques pour la santé susceptibles de découler d'une exposition répétée pendant une période pouvant couvrir la vie entière de l'espèce considérée. L'étude fournit des informations sur les effets toxiques de la substance d'essai, y compris sur son pouvoir cancérogène, et peut indiquer les organes cibles et la possibilité d'accumulation dans ces organes. Elle peut aussi donner une estimation de la dose sans effet nocif observé pour ce qui est des effets toxiques et, dans le cas de substances cancérogènes non génotoxiques, des réponses tumorales. Cette estimation permet d'établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine. De plus, il convient d'accorder une attention particulière à l'observation clinique des animaux afin d'obtenir le plus d'informations possibles.

6. Les objectifs des études de toxicité chronique et de cancérogenèse couvertes par la présente méthode d'essai sont les suivants:

— identification des propriétés cancérogènes d'un produit chimique susceptibles d'augmenter les risques de néoplasmes, la fréquence de survenue de néoplasmes malins ou la diminution du temps nécessaire à leur apparition, par rapport aux groupes témoins concurrents,

— identification du temps d'apparition de néoplasmes,

— identification de la toxicité chronique d'une substance d'essai,

— identification d'un ou de plusieurs organes cibles de la toxicité chronique et de la cancérogenèse,

— caractérisation de la relation dose-effet,

— identification d'un niveau de dose sans effet nocif observé (DSENO) ou du point de départ pour l'établissement d'une dose de référence (DR),

— extrapolation des effets cancérogènes aux niveaux d'exposition humaine correspondant à de faibles doses,

— prévision des effets de toxicité chronique aux niveaux représentatifs de l'exposition humaine,

— obtention de données permettant de vérifier les hypothèses concernant le mode d'action (2) (7) (12) (13) (14) (15).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

7. Pour caractériser et évaluer la cancérogénicité potentielle et la toxicité chronique d'une substance d'essai, le laboratoire chargé de l'étude prend en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de réaliser l'étude, afin de pouvoir orienter celle-ci de manière à tester plus efficacement les propriétés toxicologiques de la substance, et faire le moins possible appel aux animaux. La connaissance du mode d'action d'un agent cancérogène suspecté et sa prise en compte (2) (7) (12) (13) (14) (15) sont particulièrement importantes puisque la conception optimale de l'essai peut différer selon que la substance est ou n'est pas un agent cancérogène génotoxique connu ou suspecté. Des informations complémentaires sur certains aspects du mode d'action peuvent être trouvées dans le document d'orientation n° 116 (7).

8. Les informations utiles pour concevoir l'étude sont notamment: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les informations éventuelles sur son mode d'action; les résultats de toutes les études de toxicité in vitro ou in vivo menées et notamment des essais de génotoxicité; l'utilisation (les utilisations) prévue(s) et le potentiel d'exposition humaine; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques (par exemple mutagénicité, génotoxicité et pouvoir cancérogène) relatives aux substances structurellement apparentées; les données toxicocinétiques disponibles (dose unique et doses répétées, si ces données existent)

▼M4

et les résultats d'autres études à doses répétées. La détermination de la toxicité chronique et du pouvoir cancérogène n'est effectuée qu'après obtention des premiers résultats d'essais de toxicité à doses répétées menés sur 28 jours et/ou 90 jours. Les essais d'initiation-promotion de cancers à court terme peuvent aussi livrer des informations utiles. Il convient d'envisager l'adoption d'une approche par étapes pour l'étude expérimentale de cancérogenèse entreprise dans le cadre de l'évaluation globale des effets nocifs potentiels d'une substance chimique (16) (17) (18) (19).

9. Les méthodes statistiques les plus appropriées pour l'analyse des résultats, compte tenu du plan expérimental et des objectifs de l'étude, sont identifiées avant le début de l'étude. Il convient notamment de déterminer si les statistiques doivent prendre en compte l'ajustement en fonction de la survie, l'analyse des risques de tumeurs cumulées liés à la durée de survie, l'analyse du temps nécessaire à l'apparition d'une tumeur et l'analyse effectuée en cas de mort prématurée des animaux d'un ou de plusieurs groupes. On trouvera des indications concernant les analyses statistiques appropriées, ainsi que des références clés à des méthodes statistiques reconnues au plan international, dans le document d'orientation n° 116 (7), ainsi que dans le document d'orientation n° 35 sur l'analyse et l'évaluation des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (20).

10. Lors de la réalisation d'une étude de cancérogenèse, il est recommandé de toujours suivre les principes et considérations énoncés dans le document d'orientation de l'OCDE n° 19 sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques comme effets observés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité (21). Le paragraphe 62 de ce document, en particulier, stipule ce qui suit: «*Dans les études comportant l'administration de doses répétées, lorsqu'un animal présente des signes cliniques progressifs de détérioration de son état, une décision d'euthanasier ou non l'animal est prise en connaissance de cause. Cette décision met en balance des facteurs tels que la valeur des informations pouvant être obtenues en maintenant l'animal dans l'étude d'une part, et l'état général de celui-ci d'autre part. Si la décision est prise de poursuivre l'essai sur cet animal, la fréquence des observations est augmentée selon les besoins. Il est aussi possible, sans toutefois nuire à l'objectif de l'essai, d'interrompre l'administration de la substance d'essai pour soulager la douleur ou la détresse de l'animal, ou de réduire la dose testée.*»

11. On trouvera des informations détaillées et une discussion sur les principes déterminant le choix des doses pour les études de toxicité chronique et de cancérogenèse dans le document d'orientation n° 116 (7), ainsi que dans deux publications de l'Institut international des sciences de la vie (22) (23). La stratégie de base pour le choix des doses dépend du ou des principaux objectifs de l'étude (paragraphe 6). En choisissant des niveaux de doses appropriés, il convient de trouver un équilibre, entre d'une part, l'identification des dangers et, d'autre part, la caractérisation des réponses aux faibles doses et leur pertinence. Cet équilibre est particulièrement nécessaire dans le cas de l'étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse considérée ici.

12. Il convient d'examiner l'opportunité de réaliser la présente étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse plutôt que de réaliser séparément une étude de toxicité chronique (chapitre B.30 de la présente annexe) et une étude de cancérogenèse (chapitre B.32 de la présente annexe). L'essai combiné permet une meilleure efficacité en temps et en coûts, et un moindre recours aux animaux, par rapport à la conduite de deux essais séparés, et ne compromet pas la qualité des données de la phase chronique ou de la phase de cancérogenèse. Lors de la réalisation d'une telle étude combinée, il convient toutefois de respecter les principes déterminant le choix de la dose (paragraphes 11 et 22 à 26) et il est également reconnu que certains cadres réglementaires peuvent imposer la conduite d'études séparées. On trouvera dans le document d'orientation n° 116 (7) des indications supplémentaires sur les moyens de concevoir de manière optimale l'étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et en rationalisant les diverses procédures expérimentales.

▼M4

13. Les définitions utilisées dans le contexte de la présente méthode d'essai figurent à la fin du présent chapitre et dans le document d'orientation n° 116 (7).

PRINCIPE DE L'ESSAI

14. L'étude comprend deux phases parallèles: une phase chronique et une phase de cancérogenèse (dont les durées respectives font l'objet des paragraphes 34 et 35). La substance d'essai est normalement administrée par la voie orale, mais la voie inhalatoire ou la voie cutanée peuvent aussi être appropriées. Durant la phase chronique, la substance d'essai est administrée quotidiennement à plusieurs groupes d'animaux d'expérience à des doses progressives, à raison d'un niveau de dose par groupe, en général pendant une période de 12 mois, bien que des durées plus longues ou plus courtes puissent aussi être choisies en fonction des exigences réglementaires (voir paragraphe 34). Cette durée est suffisamment longue pour permettre aux effets de toxicité cumulée de se manifester, tout en évitant les effets perturbateurs des changements liés au vieillissement. Un ou plusieurs sacrifices en cours d'étude peuvent aussi être prévus, par exemple à 3 et 6 mois, auquel cas des groupes d'animaux supplémentaires pourront être inclus dans l'étude (voir paragraphe 20). Durant la phase de cancérogenèse, la substance d'essai est administrée quotidiennement à différents groupes d'animaux pendant la plus grande partie de leur vie. Au cours des deux phases, les animaux sont observés attentivement pour déceler d'éventuels signes de toxicité et le développement de lésions néoplasiques. Les animaux qui meurent ou sont sacrifiés en cours d'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont sacrifiés et autopsiés.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Choix des espèces animales

15. La présente méthode d'essai traite principalement de la caractérisation et de l'évaluation de la toxicité chronique et de la cancérogénicité chez les rongeurs (paragraphe 2). Le recours à des espèces autres que des rongeurs peut être envisagé si les données disponibles laissent escompter une meilleure prédiction des effets de la substance sur la santé humaine. Dans ce cas, le choix de l'espèce est justifié. L'espèce de rongeur préférée est le rat, mais d'autres rongeurs comme la souris peuvent être utilisés. Bien que le recours à la souris dans les études de cancérogenèse puisse ne présenter qu'un intérêt limité (24) (25) (26), certains programmes réglementaires actuels exigent tout de même la conduite d'essais de cancérogenèse sur la souris, sauf lorsqu'il est établi que de tels essais ne sont pas nécessaires sur le plan scientifique. Les rats et les souris sont les modèles expérimentaux choisis de préférence, en raison de leur durée de vie relativement courte, de leur utilisation fréquente dans les études pharmacologiques et toxicologiques, de leur sensibilité à l'induction de tumeurs et de la disponibilité de souches suffisamment caractérisées. Ces caractéristiques permettent d'obtenir une grande quantité d'informations sur la physiologie et la pathologie de ces animaux. S'il s'avérait nécessaire de réaliser des études de toxicité chronique et de cancérogenèse avec des espèces de non- rongeurs, le plan et la conduite de l'étude devraient suivre les principes décrits dans la présente méthode d'essai ainsi que dans le chapitre B.27 de la présente annexe – Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours (6). Des informations additionnelles sur le choix des espèces et des souches sont disponibles dans le document d'orientation n° 116 (7).

16. Il convient d'employer des animaux adultes sains, de souches communément utilisées dans les laboratoires. L'étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse sera effectuée de préférence sur des animaux de même souche et de même provenance que ceux utilisés dans l'étude (les études) de toxicité préliminaire(s) de plus courte durée. Si toutefois ces animaux sont réputés ne pas répondre aux critères de survie généralement admis dans les études à long terme [voir le document d'orientation n° 116 (7)], il convient d'envisager d'utiliser une souche d'un animal dont le taux de survie permette de réaliser une étude à long terme. Les femelles sont nullipares et non gravides.

▼M4

Conditions d'hébergement et d'alimentation

17. Les animaux peuvent être logés individuellement ou dans des cages en petits groupes du même sexe, l'hébergement individuel n'étant à envisager que dans des cas scientifiquement justifiés (27) (28) (29). Les cages sont placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats de l'étude soit réduite au minimum. La température du local des animaux d'expérience est de 22 °C (± 3 °C). L'humidité relative est d'au moins 30 % et n'excède pas de préférence 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit comprise entre 50 et 60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire peut être un régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété. Il satisfait tous les besoins nutritionnels de l'espèce étudiée, et la teneur en contaminants alimentaires susceptibles d'influer sur les résultats de l'essai (résidus de pesticides, polluants organiques persistants, phyto-œstrogènes, métaux lourds et mycotoxines, par exemple) est aussi faible que possible. Des données analytiques sur les teneurs en nutriments et en contaminants alimentaires sont recueillies régulièrement, au moins au début de l'étude et lors des changements de lots; ces données figurent dans le rapport final. Des données analytiques sur l'eau de boisson utilisée lors de l'étude sont de même fournies. Le choix du régime alimentaire peut être influencé par la nécessité d'assurer un mélange convenable de la substance d'essai et de satisfaire les besoins nutritionnels des animaux lorsque la substance est administrée dans la nourriture.

Préparation des animaux

18. Il convient d'utiliser des animaux sains, acclimatés aux conditions de laboratoire depuis au moins 7 jours et n'ayant jamais été soumis auparavant à des protocoles expérimentaux. Dans le cas des rongeurs, l'administration de la substance commence dès que possible après le sevrage et l'acclimatation, et de préférence avant l'âge de 8 semaines. L'espèce, la souche, la provenance, le sexe, le poids et l'âge des animaux d'expérience sont précisés. Au début de l'étude, la variation de poids des animaux de chaque sexe est minimale et n'excède pas ± 20 % du poids moyen de tous les animaux étudiés, et ce pour chaque sexe séparément. Les animaux sont affectés de manière aléatoire aux différents groupes (témoins et traités). Après la randomisation, les poids moyens des groupes de chaque sexe ne présentent pas de différences significatives. En cas de différences statistiquement significatives, la phase de randomisation est répétée dans la mesure du possible. Chaque animal reçoit un numéro d'identification unique et en est marqué de manière permanente par tatouage, implant de micropuce ou toute autre méthode appropriée.

PROTOCOLE

Nombre et sexe des animaux

19. Il convient d'utiliser des animaux des deux sexes. Leur nombre est suffisant pour permettre une évaluation biologique et statistique complète. Pour les rongeurs, chaque groupe de dose (comme défini au paragraphe 22) et chaque groupe témoin concurrent prévu pour participer à la phase de cancérogenèse de l'étude comprend donc au moins 50 animaux de chaque sexe. Selon le but de l'étude, il sera possible d'augmenter la puissance statistique des principales estimations en répartissant les animaux de manière différenciée et non égale en nombre dans les divers groupes de dose, avec plus de 50 animaux dans les groupes à faibles doses pour estimer par exemple la cancérogénicité aux faibles doses. Il convient toutefois de noter qu'une augmentation modérée de la taille d'un groupe entraînera une augmentation relativement faible de la puissance statistique de l'étude. Chaque groupe de dose (comme défini au paragraphe 22), et chaque groupe témoin concurrent prévu pour participer à la phase de toxicité chronique de l'étude, comprend au moins, dans le cas des rongeurs, 10 animaux de chaque sexe. On notera

▼M4

que ce nombre est plus faible que celui préconisé dans l'étude de toxicité chronique (chapitre B.30 de la présente annexe). L'interprétation des données obtenues à partir de ce nombre réduit d'animaux par groupe dans la phase de toxicité chronique de la présente étude combinée s'appuie cependant sur les données provenant des animaux plus nombreux étudiés lors de la phase de cancérogenèse de l'étude. Dans les études utilisant des souris, il peut être nécessaire de prévoir des animaux supplémentaires dans chaque groupe traité lors de la phase de toxicité chronique pour pouvoir effectuer tous les examens hématologiques requis. On trouvera des données complémentaires sur la conception statistique de l'étude et le choix de niveaux de doses permettant d'optimiser la puissance statistique dans le document d'orientation n° 116 (7).

Sacrifices en cours d'étude, groupes satellites et animaux sentinelles

20. L'étude peut prévoir le sacrifice d'animaux en cours d'étude, par exemple à 6 mois pour la phase de toxicité chronique, afin de recueillir des données sur la progression des altérations non néoplasiques et des données mécanistiques, si cela est scientifiquement justifié. Si l'on dispose déjà de ces données, obtenues antérieurement lors d'études de toxicité à doses répétées sur la substance d'essai, les sacrifices en cours d'étude peuvent ne pas être scientifiquement justifiés. Les animaux étudiés pendant la phase de toxicité chronique de l'étude, normalement sur une durée de 12 mois (paragraphe 34), fournissent les données correspondant aux sacrifices en cours d'étude pour la phase de cancérogenèse, ce qui réduit le nombre total d'animaux étudiés. Des groupes satellites peuvent aussi être constitués pour la phase de toxicité chronique afin de contrôler la réversibilité des éventuelles altérations toxicologiques induites par la substance d'essai. Ces investigations pourront ne porter que sur les doses maximales de l'étude et sur le groupe témoin. Un groupe supplémentaire d'animaux sentinelles (généralement 5 animaux de chaque sexe) peut être inclus si nécessaire pour le suivi de l'état pathologique au cours de l'étude (30). On trouvera des indications supplémentaires sur les sacrifices en cours d'étude et sur le recours à des animaux satellites et sentinelles, ainsi que sur la limitation du nombre total d'animaux étudiés, dans le document d'orientation n° 116 (7).

21. Si l'inclusion d'animaux satellites et/ou des sacrifices en cours d'essai sont prévus, le nombre d'animaux dans chaque groupe de dose prévu à cet effet sera normalement de 10 animaux de chaque sexe, et le nombre total d'animaux étudiés devra être augmenté du nombre d'animaux devant être sacrifiés avant l'achèvement de l'étude. Les animaux destinés à être sacrifiés en cours d'étude et les animaux satellites sont normalement sujets aux mêmes observations que ceux soumis à la phase de toxicité chronique de l'étude principale, notamment en ce qui concerne le poids corporel, la prise d'aliments et d'eau, les mesures hématologiques et de biochimie clinique, et les examens pathologiques. Toutefois, des dispositions peuvent aussi être prises (dans les groupes d'animaux sacrifiés en cours d'étude) pour limiter ces observations à des mesures essentielles spécifiques telles que la neurotoxicité ou l'immunotoxicité.

Groupes de dose et dosages

22. Le document d'orientation n° 116 (7) donne des indications sur tous les aspects du choix des doses et des écarts entre les doses. Il convient d'utiliser au moins trois doses et un groupe témoin, aussi bien pour la phase de toxicité chronique que pour la phase de cancérogenèse. Les niveaux de doses seront généralement basés sur les résultats d'études à plus court terme à doses répétées, ou d'études préliminaires de détermination des concentrations, et devront prendre en compte toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques existantes relatives à la substance d'essai ou aux substances chimiques apparentées.

▼M4

23. Pour la phase de toxicité chronique de l'étude, une étude complète portant sur trois niveaux de doses peut ne pas être considérée comme indispensable s'il est possible d'anticiper qu'un essai à dose unique, équivalant au moins à 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, ne produira probablement pas d'effets indésirables. La décision est fondée sur les résultats d'études préliminaires et sur l'absence probable de toxicité de la substance d'essai, compte tenu des données disponibles sur des substances structurellement apparentées. Une limite de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour peut s'appliquer sauf si l'exposition humaine indique qu'il est nécessaire de recourir à un niveau de dose plus élevé.

24. À moins de contraintes dues à la nature physico-chimique ou aux effets biologiques de la substance d'essai, le niveau de dose le plus élevé est choisi de manière à permettre d'identifier les principaux organes cibles et les effets toxiques de la substance tout en évitant la souffrance, une toxicité sévère ou une forte morbidité ou létalité chez les animaux testés. La plus forte dose est normalement choisie pour provoquer une manifestation de toxicité, par exemple un ralentissement de la prise de poids corporel (d'environ 10 %). Toutefois, en fonction des objectifs de l'étude (voir paragraphe 6), on pourra choisir un niveau de dose maximal plus faible que la dose qui provoque des signes de toxicité, par exemple une dose entraînant un effet négatif préoccupant mais dont l'impact sur l'espérance de vie ou le poids corporel reste faible.

25. Les niveaux de doses et les intervalles entre les doses peuvent être choisis de manière à pouvoir établir une relation dose-réponse et, selon le mode d'action de la substance d'essai, une DSENO ou tout autre résultat escompté de l'étude, notamment une DR (voir le paragraphe 27). Les facteurs à prendre en compte dans le choix des faibles doses sont notamment la pente attendue de la courbe dose-réponse, les doses qui provoquent des changements métaboliques importants ou qui modifient notablement le mode d'action toxique, le niveau auquel on peut prévoir un seuil, ou celui auquel on peut prévoir de fixer un point de départ pour une extrapolation aux faibles doses. Le principal objectif lors de la réalisation d'une étude combinée de cancérogenèse et de toxicité chronique sera la collecte d'informations à des fins d'évaluation des risques de cancérogenèse, et les données sur la toxicité chronique seront normalement un objectif subsidiaire. Il conviendra de s'en souvenir lors du choix des niveaux de doses et des intervalles entre les doses pour l'étude.

26. Les intervalles entre les doses dépendront des objectifs de l'étude et des caractéristiques de la substance d'essai, et ne peuvent donc pas être prescrits de manière détaillée dans la présente méthode d'essai, mais des intervalles correspondant à un facteur 2 ou 4 sont souvent les plus appropriés entre les doses décroissantes, et l'inclusion d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation de très grands intervalles (correspondant par exemple à un facteur de plus de 6 à 10) entre les doses. En général, les facteurs supérieurs à 10 sont évités, et leur utilisation est justifiée.

27. Comme le précise le document d'orientation n° 116 (7), les facteurs à prendre en compte dans le choix des doses sont notamment les suivants:

— non-linéarités ou points d'inflexion connus ou supposés de la courbe dose-réponse,

— toxicocinétique et gammes de doses auxquelles l'induction métabolique, la saturation ou la non-linéarité entre les doses internes et externes surviennent ou non,

— lésions précurseurs, marqueurs d'effets ou indicateurs du déroulement de processus biologiques clés sous-jacents,

▼M4

— aspects principaux (ou présumés) du mode d'action, par exemple doses auxquelles une cytotoxicité commence à se manifester, les dosages hormonaux sont perturbés, les mécanismes homéostatiques sont dépassés, etc.,

— régions de la courbe dose-réponse nécessitant une estimation particulièrement précise, par exemple dans le domaine de la DR prévue ou d'un seuil présumé,

— prise en compte des niveaux prévus d'exposition humaine, en particulier lors du choix des doses moyennes et faibles.

28. Le groupe témoin sera un groupe non traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance d'essai, les animaux du groupe témoin sont traités de la même manière que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé pour les groupes traités. Si la substance d'essai est incorporée aux aliments et entraîne une diminution sensible de la prise de nourriture liée à une moindre appétence de celle-ci, il pourra être utile d'utiliser un groupe témoin supplémentaire nourri en parallèle, qui constituerait un témoin plus approprié.

Préparation des doses et administration de la substance d'essai

29. La substance d'essai est normalement administrée par voie orale, soit dans la nourriture ou l'eau de boisson, soit par gavage. Des informations complémentaires sur les voies et méthodes d'administration figurent dans le document d'orientation n° 116 (7). La voie et le mode d'administration dépendent de la finalité de l'étude, des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai, de sa biodisponibilité ainsi que de la voie et du mode prédominants d'exposition humaine. Il convient de justifier le choix de la voie et du mode d'administration. Dans l'intérêt des animaux, le gavage oral n'est normalement choisi que pour les substances pour lesquelles cette voie et ce mode d'administration correspondent à une voie d'exposition potentielle raisonnable chez l'homme (produits pharmaceutiques, par exemple). Dans le cas des produits chimiques alimentaires ou environnementaux, notamment les pesticides, l'administration se fait d'ordinaire via le régime alimentaire ou l'eau de boisson. Toutefois, dans certains contextes, tels que l'exposition professionnelle, l'administration par d'autres voies peut être plus appropriée.

30. Si nécessaire, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Il convient de prendre en compte les caractéristiques suivantes du véhicule et des autres additifs, s'il y a lieu: effets sur l'absorption, la répartition, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité; et effets sur la prise d'aliments ou d'eau, ou sur l'état nutritionnel des animaux. Il est recommandé, chaque fois que les circonstances le permettent, d'envisager en premier lieu l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse, puis celle d'une solution ou d'une émulsion dans une huile (par exemple huile de maïs), et en dernier lieu celle d'une solution dans d'autres véhicules. Les caractéristiques de toxicité des véhicules autres que l'eau sont connues. Il convient de disposer de données sur la stabilité de la substance d'essai et sur l'homogénéité des solutions ou rations contenant les différentes doses (selon les cas) dans les conditions d'administration (nourriture, par exemple).

31. Il importe de veiller à ce que les quantités de substances d'essai administrées dans les aliments ou l'eau de boisson n'interfèrent pas avec la nutrition ou avec l'équilibre hydrique. Dans les études de toxicité à long terme faisant intervenir une administration par voie alimentaire, la concentration de la substance d'essai dans les aliments ne dépasse normalement pas 5 % de la ration totale, afin d'éviter les déséquilibres nutritionnels. Si la substance d'essai est incorporée à la nourriture, on peut utiliser soit une concentration alimentaire constante (mg/kg d'aliment ou ppm) soit un niveau de dose constant par rapport au poids corporel de l'animal (mg/kg de poids corporel), calculé sur une base hebdomadaire. La solution choisie est spécifiée.

▼M4

32. En cas d'administration par voie orale, les animaux reçoivent une dose quotidienne de la substance d'essai (à raison de 7 jours par semaine) et ce pendant une période de 12 mois (phase chronique) ou de 24 mois (phase de cancérogenèse) pour les rongeurs (voir aussi les paragraphes 33 et 34). Tout autre régime de dosage, par exemple une administration 5 jours par semaine, donne lieu à une justification. En cas d'administration par voie cutanée, les animaux reçoivent normalement le traitement pendant au moins 6 heures par jour, 7 jours par semaine, comme le spécifie le chapitre B.9 de la présente annexe (11), et ce pendant une période de 12 mois (phase chronique) ou de 24 mois (phase de cancérogenèse). L'exposition par inhalation est réalisée pendant 6 heures par jour, 7 jours par semaine, mais il est possible, si cela se justifie, de limiter l'exposition à 5 jours par semaine. La période d'exposition est normalement de 12 mois (phase chronique) ou de 24 mois (phase de cancérogenèse). Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées «nez seul», il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Le choix d'une durée d'exposition inférieure à 6 heures par jour fait l'objet d'une justification. Voir aussi à ce sujet le chapitre B.8 de la présente annexe (9).

33. Lorsque la substance d'essai est administrée aux animaux par gavage, l'opération est pratiquée aux mêmes moments de la journée au moyen d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Normalement, une dose unique sera administrée une fois par jour mais lorsque, par exemple, la substance chimique est un irritant local, il pourra être envisagé de maintenir la dose journalière en la fractionnant (deux fois par jour). Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal d'expérience. Le volume est maintenu aussi faible que possible et n'excède normalement pas 1 ml/100 g de poids corporel pour les rongeurs (31). Il convient de minimiser la variabilité du volume testé en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à tous les niveaux de doses. Les substances potentiellement corrosives ou irritantes sont l'exception et leur dilution permettra d'éviter tout effet local sévère. L'essai n'est pas mené à des concentrations susceptibles d'être corrosives ou irritantes pour le tube digestif.

Durée de l'étude

34. Si la période d'administration et la durée de la phase chronique de cette étude sont normalement de 12 mois, le plan de l'étude permet une application à des essais de durée plus courte (6 à 9 mois par exemple) ou plus longue (18 à 24 mois), pour répondre aux exigences de régimes réglementaires particuliers ou obtenir des données mécanistiques spécifiques. Les déviations par rapport à une durée d'exposition de 12 mois font l'objet de justifications, surtout dans le cas de durées plus courtes. Le traitement de tous les groupes de doses affectés à cette phase est interrompu au moment prévu pour l'évaluation de la toxicité chronique et de lésions pathologiques non néoplasiques. Les groupes satellites inclus pour contrôler la réversibilité des éventuelles altérations toxicologiques induites par la substance d'essai sont maintenus sans traitement, pendant une période d'au moins 4 semaines et d'au plus un tiers de la durée totale de l'étude, après la cessation de l'exposition.

35. La durée de la phase de cancérogenèse de cette étude sera normalement de 24 mois pour les rongeurs, ce qui correspond à la majeure partie de la durée de vie normale des animaux utilisés. Elle peut être allongée ou raccourcie selon la durée de vie de la souche de l'espèce animale utilisée, mais ce changement de durée fait l'objet d'une justification. Pour certaines souches particulières de souris, par exemple AKR/J, C3H/J ou C57BL/6J, une durée de 18 mois peut être plus appropriée. On trouvera ci- après des informations sur la durée, la clôture de l'étude et la survie; d'autres considérations, relatives notamment à l'acceptabilité d'une étude de cancérogenèse estimée négative du fait de la survie des animaux, figurent dans le document d'orientation n° 116 (7):

▼M4

— la clôture de l'étude est envisagée lorsque le nombre de survivants des groupes soumis aux plus faibles doses ou du groupe témoin tombe en dessous de 25 pour cent,

— la clôture de l'étude n'est pas déclenchée par la mort prématurée des animaux du seul groupe ayant reçu la dose la plus élevée,

— la survie des animaux est prise en considération séparément pour chaque sexe,

— l'étude n'est pas prolongée au-delà du point où les données pouvant être tirées de l'étude ne sont plus suffisantes pour permettre une évaluation statistiquement valable.

OBSERVATIONS (PHASE DE TOXICITÉ CHRONIQUE)

36. Tous les animaux sont soumis à un examen quotidien, généralement en début et en fin de journée, fins de semaine et jours fériés compris, pour déterminer la morbidité et la mortalité. Des observations cliniques générales sont effectuées au moins une fois par jour, de préférence au(x) même(s) moment(s) de la journée, en tenant compte du moment où l'on prévoit que les effets des différentes doses atteindront leur intensité maximale après administration par gavage.

37. Tous les animaux font l'objet d'observations cliniques détaillées au moins une fois avant la première exposition (pour permettre des comparaisons intra-individuelles), à la fin de la première semaine de l'étude, et une fois par mois ensuite. Les observations respectent un protocole qui réduit au minimum les variations entre observateurs et les rend indépendantes du groupe testé. Ces observations sont effectuées hors de la cage où sont logés les animaux, de préférence dans une enceinte normalisée et à heures fixes. Elles sont soigneusement consignées, de préférence en utilisant un système de cotation explicitement défini par le laboratoire qui réalise l'essai. Les conditions d'observation demeurent aussi constantes que possible. Les observations portent notamment sur les symptômes suivants (sans que cette liste soit exhaustive): modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux et des muqueuses, apparition de sécrétions et d'excrétions, et réactions neurovégétatives (par exemple, sécrétion de larmes, horripilation, variation du diamètre pupillaire, respiration anormale). Il convient également de consigner les changements dans la démarche, la posture et les réactions à la manipulation, ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques et les comportements stéréotypés (par exemple, toilettage excessif, parcours circulaires répétitifs) ou bizarres (par exemple, automutilation, marche à reculons) (32).

38. Avant la première administration de la substance d'essai, tous les animaux font l'objet d'un examen ophtalmologique effectué à l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un autre appareil approprié. À l'issue de l'étude, cet examen est réalisé de préférence sur tous les animaux, mais au moins sur ceux du groupe traité à la dose la plus élevée et du groupe témoin. Si des altérations oculaires liées au traitement sont détectées, tous les animaux sont examinés. Si l'analyse structurale ou d'autres observations suggèrent une toxicité oculaire, il faut augmenter la fréquence des examens oculaires.

39. Dans le cas de substances ayant présenté un potentiel d'induction d'effets neurotoxiques lors d'essais antérieurs de toxicité à doses répétées sur 28 et/ou 90 jours, une vérification de la réactivité sensorielle à différents types de stimuli (32) (stimuli auditifs, visuels ou proprioceptifs, par exemple) (33) (34) (35) et une évaluation de la force de préhension (36) ainsi que de l'activité motrice (37) pourront être menées en option. Elles seront réalisées avant le début de l'étude et tous les 3 mois par la suite, jusqu'à 12 mois inclusivement, ainsi qu'à la fin de l'étude (si celle-ci dure plus de 12 mois). On trouvera dans les références bibliographiques susmentionnées une description plus détaillée des modes opératoires. Toutefois, d'autres modes opératoires que ceux figurant dans ces références sont également utilisables.

▼M4

40. Dans le cas de substances ayant présenté un potentiel d'induction d'effets immunotoxiques lors d'essais antérieurs de toxicité à doses répétées sur 28 et/ou 90 jours, d'autres examens sur cet effet peuvent être menés en option à la fin de l'étude.

Poids corporel, prise d'aliments et d'eau, et efficacité alimentaire

41. Tous les animaux sont pesés au début du traitement, au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. La prise d'aliments et l'efficacité alimentaire sont aussi mesurées au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Lorsque la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la prise d'eau est aussi mesurée au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Il peut également être utile de mesurer la prise d'eau dans les études où celle- ci est modifiée.

Hématologie et biologie clinique

42. Dans les études faisant intervenir des rongeurs, des examens hématologiques sont effectués sur tous les animaux d'expérience (10 mâles et 10 femelles par groupe) à 3, 6 et 12 mois, ainsi qu'à la fin de l'étude (si celle-ci dure plus de 12 mois). Si des souris sont utilisées, il peut être nécessaire de constituer des groupes satellites afin de pouvoir effectuer tous les examens hématologiques requis (voir paragraphe 19). Dans les études faisant intervenir des non-rongeurs, les échantillons seront prélevés sur un plus petit nombre d'animaux (par exemple 4 animaux de chaque sexe par groupe dans les études chez le chien), à des stades intermédiaires et à la fin de l'étude, de la même manière que chez les rongeurs. Il ne sera pas nécessaire d'effectuer des examens à 3 mois, chez les rongeurs comme chez les autres animaux, si aucun effet sur les paramètres hématologiques n'a été observé lors d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables. Les échantillons de sang sont prélevés en un point déterminé, par exemple par ponction cardiaque ou au niveau du sinus rétro-orbitaire, sous anesthésie.

43. Les investigations portent sur les paramètres suivants (38): numération leucocytaire totale et différentielle, numération érythrocytaire et plaquettaire, concentration d'hémoglobine, hématocrite (volume cellulaire sanguin après centrifugation), volume corpusculaire moyen (VCM), hémoglobine corpusculaire moyenne (HCM), concentration d'hémoglobine corpusculaire moyenne (CHCM), temps de prothrombine et temps de thromboplastine partielle activée. D'autres paramètres hématologiques tels que les corps de Heinz et autres anomalies morphologiques érythrocytaires ou la méthémoglobine peuvent être étudiés si nécessaire en fonction de la toxicité de la substance d'essai. Dans l'ensemble, il convient d'adapter l'approche suivie à l'effet observé et/ou attendu d'une substance d'essai donnée. Si la substance d'essai exerce un effet sur le système hématopoïétique, des numérations réticulocytaires et une cytologie médullaire peuvent être également indiquées mais n'ont pas à être pratiquées de manière systématique.

44. Des analyses de biochimie clinique, visant à étudier les principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur le rein et le foie, sont effectuées à partir d'échantillons de sang prélevés sur tous les animaux étudiés (10 mâles et 10 femelles par groupe) à des intervalles de temps semblables à ceux spécifiés pour les examens hématologiques. Si des souris sont utilisées, il peut être nécessaire de constituer des groupes satellites afin de pouvoir effectuer toutes les analyses de biochimie clinique nécessaires. Dans les études faisant intervenir des non-rongeurs, les échantillons seront prélevés sur un plus petit nombre d'animaux (par exemple 4 animaux de chaque sexe par groupe dans les études chez le chien), à des stades intermédiaires et à la fin de l'étude, de la même manière que chez les

▼M4

rongeurs. Des examens à 3 mois, chez les rongeurs comme chez les autres animaux, sont superflus si aucun effet sur les paramètres de biochimie clinique n'a été observé lors d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables. Il est recommandé de faire jeûner les animaux (à l'exception des souris) pendant la nuit qui précède la prise de sang ([1]). Les investigations portent sur les paramètres suivants (38): glucose, urée (azote uréique), créatinine, protéines totales, albumine, calcium, sodium, potassium, cholestérol total, au moins deux enzymes révélatrices des effets hépatocellulaires (alanine aminotransférase, aspartate aminotransférase, glutamate déshydrogénase, acides biliaires totaux) (39) et au moins deux enzymes révélatrices des effets hépatobiliaires (phosphatase alcaline, gamma- glutamyl transférase, 5'-nucléotidase, bilirubine totale, acides biliaires totaux) (39). D'autres paramètres de chimie clinique, tels que les triglycérides à jeun, des hormones spécifiques et la cholinestérase peuvent être mesurés si nécessaire en fonction de la toxicité de la substance d'essai. Dans l'ensemble, il convient d'adapter l'approche suivie à l'effet observé et/ou attendu d'une substance d'essai donnée.

45. Des analyses d'urine sont effectuées à partir d'échantillons prélevés sur tous les animaux étudiés (10 mâles et 10 femelles par groupe) à des intervalles de temps semblables à ceux spécifiés pour les examens hématologiques et de chimie clinique. Il ne sera pas nécessaire d'effectuer des dosages à 3 mois si les analyses d'urine pratiquées dans le cadre d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables n'ont révélé aucun effet. La liste suivante de paramètres à étudier fait partie d'une recommandation d'experts relative aux études de pathologie clinique (38): aspect, volume, osmolalité ou poids spécifique, pH, protéines totales et glucose. D'autres mesures, notamment la recherche de corps cétoniques, d'urobilinogène, de bilirubine et de sang occulte, peuvent aussi être réalisées. L'étude d'autres paramètres peut aussi s'avérer nécessaire pour élargir les recherches sur l'effet ou les effets observés.

46. On considère généralement que dans les études portant sur des chiens, il est nécessaire de déterminer les variables hématologiques et de biochimie clinique de base avant le début du traitement, mais que ce n'est pas indispensable dans les études portant sur des rongeurs (38). Toutefois, si l'on ne dispose pas de données historiques de base appropriées (voir paragraphe 58), il convient d'envisager d'en obtenir.

PATHOLOGIE

Autopsie macroscopique

47. Tous les animaux de l'étude font normalement l'objet d'une autopsie macroscopique complète et détaillée, comprenant un examen attentif de la surface externe du corps et de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leurs contenus. Toutefois, des dispositions peuvent aussi être prises (dans les groupes d'animaux sacrifiés en cours d'étude ou les groupes satellites) pour limiter ces observations à des mesures essentielles spécifiques telles que la neurotoxicité ou l'immunotoxicité (voir paragraphe 21). Il n'est pas nécessaire que ces animaux fassent l'objet d'une autopsie, ni des procédures ultérieures décrites dans les paragraphes qui suivent. L'autopsie des animaux sentinelles pourra devoir être effectuée au cas par cas, à la discrétion du directeur de l'étude.

([1]) Pour un certain nombre de dosages effectués sur le sérum ou le plasma, et plus particulièrement pour le dosage du glucose, il est préférable de faire jeûner les animaux durant la nuit qui précède la prise de sang. En l'absence de jeûne, la variabilité des résultats est en effet plus grande, et risque de masquer des effets plus subtils ainsi que de rendre l'interprétation plus difficile. En revanche, le jeûne peut modifier le métabolisme général des animaux et, en particulier dans les études d'alimentation, perturber l'exposition quotidienne à la substance d'essai. Tous les animaux sont évalués dans le même état physiologique et il sera donc préférable de programmer les évaluations détaillées ou neurologiques pour un autre jour que celui des prélèvements de biochimie clinique.

▼**M4**

48. Il convient de déterminer le poids des organes de tous les animaux hormis ceux mentionnés dans la dernière partie du paragraphe 47. Les glandes surrénales, le cerveau, les épididymes, le cœur, les reins, le foie, les ovaires, la rate, les testicules, la thyroïde (pesée après fixation, avec les glandes parathyroïdes) et l'utérus de tous les animaux (excepté ceux trouvés moribonds et/ou ayant été sacrifiés en cours d'étude) sont débarrassés, le cas échéant, de tout tissu adhérent et pesés à l'état frais dès que possible après la dissection, pour prévenir la dessiccation.

49. Les tissus suivants sont conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu (40) (l'examen des tissus indiqués entre crochets est facultatif):

toutes les lésions	macroscopiques	ganglions lymphatiques	(superficiels et profonds)
muscle squelettique	rein	aorte	glande coagulante
nerf périphérique	[sternum]	[bulbe olfactif]	glande de Harder
[voies respiratoires supérieures dont nez, cornets et sinus paranasaux]	testicule	cæcum	glande lacrymale (exorbitale)
œil (dont rétine)	thymus	cerveau (segments d'encéphale, de cervelet et de bulbe rachidien/pont)	glande mammaire (obligatoire pour les femelles et, si visible à la dissection, aussi pour les mâles)
œsophage	thyroïde	cœur	glande salivaire
ovaire	trachée	col utérin	glande surrénale
pancréas	[uretère]	côlon	hypophyse
parathyroïde	[urètre]	[dents]	iléon
peau	utérus (col inclus)	duodénum	jéjunum
poumon	vagin	épididyme	[langue]
prostate	vésicule biliaire (pour les espèces autres que le rat)	estomac (pré-estomac, moelle épinière rate vésicule séminale estomac glandulaire)	(niveaux cervical, mésothoracique et lombaire)
[fémur avec articulation]	segment de moelle osseuse et/ou moelle osseuse fraîchement ponctionnée	rectum	vessie
foie			

▼M4

Dans le cas des organes allant par paires, par exemple les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont préservés. Les observations, notamment cliniques, peuvent amener à examiner d'autres tissus. Tous les organes considérés comme des organes cibles potentiels du fait des propriétés connues de la substance d'essai sont aussi conservés. Dans les études portant sur une administration par la voie cutanée, il y a lieu d'examiner les organes figurant sur la liste établie pour la voie orale et de procéder à un prélèvement et une conservation spécifiques de la peau provenant du site d'application. Dans les études par inhalation, la liste des tissus des voies respiratoires conservés et examinés est conforme aux recommandations des chapitres B.8 (9) et B.29 (10) de la présente annexe. Pour les autres organes et tissus (outre les tissus des voies respiratoires spécifiquement conservés), il convient d'examiner les organes de la liste établie pour la voie orale.

Histopathologie

50. Des informations sont disponibles sur les meilleures pratiques en matière de conduite des études de pathologie toxicologique (40). Au minimum, les examens devront porter sur les tissus suivants:

— tous les tissus prélevés dans le groupe à dose élevée et le groupe témoin,

— tous les tissus prélevés sur les animaux morts ou sacrifiés au cours de l'étude,

— tous les tissus présentant des anomalies macroscopiques,

— tissus des organes cibles, ou tissus présentant des altérations dues au traitement dans le groupe à dose élevée, prélevés sur tous les animaux de tous les autres groupes de doses,

— dans le cas des organes allant par paires, comme les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont examinés.

OBSERVATIONS (PHASE DE CANCÉROGENÈSE)

51. Un examen de la morbidité ou de la mortalité est effectué quotidiennement chez tous les animaux, généralement en début et en fin de journée, fins de semaine et jours fériés compris. Une recherche de signes spécifiques significatifs sur le plan toxicologique est aussi effectuée une fois par jour. Dans le cas d'une étude par gavage, les animaux sont examinés immédiatement après l'administration de la dose. Une attention particulière devra être accordée au développement de tumeurs, et le moment d'apparition, la localisation, les dimensions, l'aspect et la progression de chaque tumeur nettement visible ou palpable sont consignés.

52. Tous les animaux sont pesés au début du traitement, au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. La prise d'aliments et l'efficacité alimentaire sont aussi mesurées au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Lorsque la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la prise d'eau est aussi mesurée au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Il peut également être utile de mesurer la prise d'eau dans les études où celle- ci est modifiée.

▼**M4**

Hématologie, biochimie clinique et autres mesures

53. Afin d'obtenir le plus possible d'informations de l'étude, surtout en ce qui concerne le mode d'action de la substance, il peut être utile d'effectuer des prélèvements sanguins afin de procéder à des analyses hématologiques et de biochimie clinique, mais la décision concernant ces prélèvements appartient au directeur de l'étude. Des analyses d'urine peuvent être aussi appropriées. Les données obtenues sur les animaux étudiés dans la phase de toxicité chronique, normalement d'une durée de 12 mois (voir paragraphe 34), renseignent sur ces paramètres. On trouvera des informations complémentaires sur l'intérêt de tels prélèvements pour une étude de cancérogenèse dans le document d'orientation n° 116 (7). Les éventuels prélèvements sanguins sont à recueillir à la fin de l'étude, juste avant ou pendant le sacrifice des animaux. Ils sont effectués en un point déterminé, par exemple par ponction cardiaque ou au niveau du sinus rétro-orbital, sous anesthésie. Des étalements sanguins peuvent aussi être préparés en vue d'un examen, notamment si la moelle osseuse semble être l'organe cible, bien que l'utilité d'un tel examen pour l'évaluation du potentiel cancérogène/oncogène pendant la phase de cancérogenèse ait été mise en question (38).

PATHOLOGIE

Autopsie macroscopique

54. Tous les animaux de l'étude à l'exception des sentinelles et autres animaux satellites (voir paragraphe 20), font l'objet d'une autopsie macroscopique complète et détaillée, comprenant un examen attentif de la surface externe du corps et de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leurs contenus. L'autopsie des sentinelles et autres animaux satellites peut être effectuée au cas par cas, à la discrétion du directeur de l'étude. La pesée des organes ne fait normalement pas partie d'une étude de cancérogenèse car les changements liés à l'âge ou, dans des phases plus avancées, au développement de tumeurs rendent superflues les données relatives au poids des organes. Ces données peuvent toutefois présenter un grand intérêt pour les évaluations fondées sur le poids de la preuve, notamment en ce qui concerne le mode d'action. Si ces données font partie d'une étude satellite, elles sont collectées dans l'année suivant le début de l'étude.

55. Les tissus suivants sont conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu (40) (l'examen des tissus indiqués entre crochets est facultatif):

toutes les lésions macroscopiques	ganglions lymphatiques	(superficiels et profonds)	muscle squelettique
rein	aorte	glande coagulante	nerf périphérique
[sternum]	[bulbe olfactif]	glande de Harder	[voies respiratoires supérieures dont nez, cornets et sinus paranasaux]
testicule	cæcum	glande lacrymale (exorbitale)	œil (dont rétine)
thymus	cerveau (segments d'encéphale, de cervelet et de bulbe rachidien/pont)	glande mammaire (obligatoire pour les femelles et, si visible à la dissection, aussi pour les mâles)	œsophage
thyroïde	cœur	glande salivaire	ovaire
trachée	col utérin	glande surrénale	pancréas
[uretère]	côlon	hypophyse	parathyroïde

▼**M4**

[urètre]	[dents]	iléon	peau
utérus (col inclus)	duodénum	jéjunum	poumon
vagin	épididyme	[langue]	prostate
vésicule biliaire (pour les espèces autres que le rat)	estomac (pré-estomac, moelle épinière rate vésicule séminale	estomac glandulaire)	(niveaux cervical, méso-thoracique et lombaire)
[fémur avec articulation]	segment de moelle osseuse et/ou aspirat frais	rectum	vessie
foie			

Dans le cas des organes allant par paires, par exemple les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont préservés. Les observations, notamment cliniques, peuvent amener à examiner d'autres tissus. Tous les organes considérés comme des organes cibles potentiels du fait des propriétés connues de la substance d'essai sont aussi conservés. Dans les études portant sur une administration par la voie cutanée, il y a lieu d'examiner les organes figurant sur la liste établie pour la voie orale et de procéder à un prélèvement et une conservation spécifiques de la peau provenant du site d'application. Dans les études par inhalation, la liste des tissus des voies respiratoires conservés et examinés est conforme aux recommandations des chapitres B.8 (8) et B.29 (9) de la présente annexe. Pour les autres organes et tissus (outre les tissus des voies respiratoires spécifiquement conservés), il convient d'examiner les organes de la liste établie pour la voie orale.

Histopathologie

56. Des informations sont disponibles sur les meilleures pratiques en matière de conduite des études de pathologie toxicologique (40). Au minimum, les examens histopathologiques devront porter sur les tissus suivants:

— tous les tissus prélevés dans le groupe à dose élevée et le groupe témoin,

— tous les tissus prélevés sur les animaux morts ou sacrifiés au cours de l'étude,

— tous les tissus présentant des anomalies macroscopiques, notamment des tumeurs,

— lorsque des altérations histopathologiques dues au traitement sont observées dans le groupe à dose élevée, ces mêmes tissus sont examinés chez tous les animaux de tous les autres groupes de doses,

— dans le cas des organes allant par paires, comme les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont examinés.

▼M4

RÉSULTATS ET RAPPORT (CANCÉROGENÈSE ET TOXICITÉ CHRONIQUE)

Résultats

57. Des données sont recueillies pour chaque animal sur tous les paramètres évalués. En outre, toutes les données sont résumées sous forme de tableaux synoptiques indiquant, pour chaque groupe expérimental, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, le moment de la mort ou du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, la description des signes de toxicité observés, ainsi que le moment de l'apparition, la durée et la gravité de tous les effets toxiques observés, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion. Les tableaux récapitulatifs présentent les moyennes et les écarts-types (pour les données recueillies en continu) pour les animaux présentant des effets toxiques ou des lésions, ainsi qu'une cotation des lésions.

58. Les données de contrôle historiques peuvent faciliter l'interprétation des résultats de l'étude, par exemple lorsque les données provenant des témoins concurrents semblent diverger de manière significative de données récentes obtenues sur des animaux témoins issus de la même installation d'essai/colonie d'élevage. Si elles sont évaluées, les données de contrôle historiques émanent du même laboratoire, portent sur des animaux du même âge et de la même souche, produits dans les cinq ans précédant l'étude en question.

59. Si possible, les résultats numériques sont évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Les méthodes statistiques et les données à analyser sont choisies au moment de la conception de l'étude (paragraphe 9). Ce choix permet d'opérer des ajustements en fonction de la survie, si nécessaire.

60. Le rapport d'essai mentionne les informations suivantes:

Substance d'essai:

— état physique, pureté et propriétés physico-chimiques,

— données d'identification,

— provenance de la substance,

— numéro de lot,

— certificat d'analyse chimique.

Véhicule (le cas échéant):

— justification du choix du véhicule (s'il est autre que l'eau).

Animaux d'expérience:

— espèce/souche utilisée et justification du choix fait,

— nombre, âge et sexe des animaux au début de l'essai,

— provenance, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,

— poids de chaque animal au début de l'essai.

▼**M4**

Conditions expérimentales:

— justification de la voie d'administration et du choix des doses,

— le cas échéant, méthodes statistiques utilisées pour analyser les données,

— détails concernant la formulation de la substance d'essai ou son incorporation dans les aliments,

— données analytiques sur la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation,

— voie d'administration et détails concernant l'administration de la substance d'essai,

— pour les études par inhalation, mention de la voie d'entrée (nez seul ou corps entier),

— doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et, le cas échéant, facteur de conversion en dose réelle de la concentration de la substance d'essai (en mg/kg ou en ppm) dans les aliments ou l'eau de boisson,

— détails concernant la qualité de l'alimentation et de l'eau de boisson.

Résultats (les résultats comprendront des données générales sous forme de tableaux synoptiques et des données propres à chaque animal)

Résultats généraux:

— données sur la survie,

— poids corporel/variations du poids corporel,

— prise d'aliments, calculs de l'efficacité alimentaire, si effectués, et prise d'eau, le cas échéant,

— données toxicocinétiques (si disponibles),

— ophtalmoscopie (si disponible),

— hématologie (si disponible),

— chimie clinique (si disponible).

Résultats cliniques:

— signes de toxicité,

— incidence (et, si elle est évaluée, sévérité) de toute anomalie observée,

— nature, sévérité et durée des observations cliniques (transitoires ou permanentes).

Données relatives aux autopsies:

— poids corporel à l'issue de l'essai,

— poids des organes et leur rapport au poids corporel, le cas échéant,

— résultats d'autopsie; incidence et sévérité des anomalies.

Histopathologie:

— observations d'effets histopathologiques non néoplasiques,

— observations d'effets histopathologiques néoplasiques,

▼**M4**

— corrélation entre les observations macroscopiques et microscopiques,

— description détaillée de tous les résultats histopathologiques liés au traitement et échelle d'évaluation de la sévérité,

— apport sur l'analyse éventuelle des lames par des pairs.

Traitement statistique des résultats, le cas échéant

Discussion des résultats, notamment:

— examen de toutes les approches de modélisation,

— relations dose-réponse,

— données de contrôle historiques,

— examen de toutes les informations concernant le mode d'action,

— détermination des DR, DSENO et DMENO (dose minimale avec effet nocif observé),

— applicabilité des résultats à l'être humain.

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE:

(1) OCDE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), document de travail interne, direction de l'environnement, OCDE, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208

(4) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191

(5) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445

(6) Chapitre B.27 de la présente annexe, Essai de toxicité subchronique par voie orale – Toxicité orale à doses répétes – non rongeurs: 90 jours.

(7) OCDE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Série sur les essais et évaluations n° 116, disponible sur le site internet public de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (www.oecd.org/env/testguidelines).

(8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Série sur les essais et évaluations n° 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(9) Chapitre B.8 de la présente annexe. Toxicité subaiguë par inhalation: étude sur 28 jours.

(10) Chapitre B.29 de la présente annexe, Toxicité subchronique par inhalation: étude sur 90 jours.

(11) Chapitre B.9 de la présente annexe, Toxicité à doses répétées (28 jours) (administration cutanée).

▼**M4**

(12) Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D., Farland W. (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.

(13) Cohen S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., Fenner-Crisp P.A. (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

(14) Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L., Dragan Y.P. (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

(15) Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J., Patton D.E. (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

(16) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1-7.

(17) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Crit. Rev. Toxicol. 36: 9-35.

(18) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al*. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 37-68.

(19) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 69-98.

(20) OCDE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Série sur les essais et évaluations n° 35 et série sur les pesticides n° 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OCDE, Paris.

(21) OCDE (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Série sur les essais et évaluations n° 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.

(22) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths S.A., Parkinson C., McAuslane J.A.N. and Lumley C.E. (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

(25) Usui T., Griffiths S.A. and Lumley C.E. (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy P.O.F. & Harron D.W.G. (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.

(26) Carmichael N.G., Enzmann H., Pate I., Waechter F. (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect 105:1196-1203.

▼**M4**

(27) Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (JO L 276 du 20.10.2010, p. 33).

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, DC, US. Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology, 21:15-23.

(32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(33) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(34) Gad S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

(35) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(36) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

(37) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(38) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al*. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(39) EMEA (draft) document «Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity» (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(40) Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Appendice 1

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼B

B.34. **TEST DE REPRODUCTION SUR UNE GÉNÉRATION**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Voir introduction générale, partie B.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Néant.

1.4. PRINCIPES DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance à tester est administrée à des doses croissantes à plusieurs groupes d'animaux mâles et femelles. Les mâles devraient être traités durant leur croissance et pendant au moins un cycle complet de spermatogenèse (environ 56 jours chez la souris et 70 jours chez le rat) afin de permettre à la substance de produire quelques effets nocifs sur la spermatogenèse.

Les femelles de la génération P seront traitées pendant au moins deux cycles œstraux complets afin de permettre a la substance testée de produire quelques effets nocifs sur l'œstrus. Les animaux sont ensuite accouplés. La substance testée est administrée aux animaux des deux sexes pendant la période d'accouplement, puis uniquement aux femelles durant la période de gestion et d'allaitement. Si l'on veut administrer la substance par voie respiratoire (inhalation), la méthode nécessite des adaptations.

1.5. CRITÈRE QUALITATIF

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparations

Avant l'essai, de jeunes animaux adultes et sains sont randomisés et répartis par groupes traités et témoins. Les animaux sont maintenus dans les conditions expérimentales de stabulation et d'alimentation pendant au moins 5 jours avant l'expérience. Il est recommandé d'administrer la substance à tester dans la nourriture ou dans l'eau de boisson. D'autres voies d'administration sont également acceptables. La même méthode d'administration sera utilisée pour tous les animaux durant la période expérimentale appropriée. Si un véhicule ou d'autres additifs sont utilisés pour faciliter le traitement, ils devraient être reconnus sans effet toxique. Le traitement devrait être effectué pendant les 7 jours de la semaine.

▼B

Animaux d'expérience

Choix de l'espèce:

L'espèce convenant le mieux est celle du rat ou de la souris. Des souches à faible taux de fécondité ne devraient pas être utilisées. Des animaux sains n'ayant pas été déjà utilisés dans une expérimentation devraient être utilisés. L'espèce, la souche, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience seront spécifiés.

Pour évaluer de façon adéquate la fécondité, mâles et femelles devraient tous deux être étudiés. Tous les animaux traités et témoins devraient être sevrés avant le début du traitement.

Nombre et sexe:

Chaque groupe traité et chaque groupe témoin devrait comporter un nombre d'animaux suffisant pour obtenir environ 20 femelles gravides arrivées à terme ou proches de celui-ci.

L'objectif est d'obtenir un nombre de gestations et de portées suffisant pour permettre une évaluation valable de l'influence de la substance sur la fertilité, la gestation, le comportement maternel des animaux de la génération P ainsi que l'allaitement, la croissance et le développement de la génération F_1, de la conception au sevrage.

Conditions d'essai

La nourriture et l'eau devraient être fournies à satiété. Lorsqu'elles seront proches du terme, les femelles gravides devraient être placées dans des cages individuelles de mise bas ou de maternité et il peut leur être fourni les matériaux de nidification nécessaires.

Doses

Au moins trois groupes traités et un groupe témoin seront utilisés. Si un véhicule est utilisé pour administrer la substance testée, le groupe témoin recevra le volume maximal de véhicule ayant été utilisé. Si une substance à tester entraîne une réduction de la consommation alimentaire ou de l'assimilation, il peut être nécessaire d'utiliser un groupe témoin apparié. Dans les conditions idéales et à moins que la nature physique/chimique ou les effets biologiques de la substance testée ne s'y opposent dans une certaine mesure, le niveau de dose le plus élevé produira un effet toxique sans toutefois entraîner la mort des animaux parentaux (P). La(les) dose(s) intermédiaire(s) devrait(ent) produire des effets toxiques minima attribuables à la substance testée, et la dose faible ne devrait produire aucun effet nocif observable sur les parents ou leur progéniture. Lorsque la substance est administrée par gavage ou en capsule, la dose administrée à chaque animal devrait être établie en fonction du poids corporel de chaque animal et fera l'objet d'un ajustement hebdomadaire afin de tenir compte des modifications de poids corporel. Pour les femelles pendant la gestation, le traitement peut, si on le souhaite, être établi en fonction du poids corporel au jour 0 ou au jour 6 de la gestation.

Essai de limite

Dans le cas de substances faiblement toxiques, si un niveau de dose d'au moins 1 000 mg/kg n'entraîne aucune interférence sur les capacités de reproduction, des études à d'autres niveaux de doses peuvent être considérées non nécessaires. Si une étude préliminaire effectuée avec le niveau de dose élevé, avec une toxicité évidente chez la mère, n'a aucun effet nocif sur la fertilité, on peut juger inutile d'effectuer des études avec d'autres niveaux de doses.

▼B

Mode opératoire

Plan d'expérience

On devrait commencer à administrer quotidiennement la substance aux mâles géniteurs (P) lorsqu'ils auront atteints l'âge de 5 à 9 semaines, après qu'ils auront été sevrés et acclimatés pendant au moins 5 jours. Chez les rats, le traitement est poursuivi pendant 10 semaines, avant la période d'accouplement (pour les souris, 8 semaines). Les mâles devraient être sacrifiés et examinés soit à la fin de la période d'accouplement soit alternativement maintenus en vie avec poursuite de l'administration de la substance dans la nourriture, en vue de la production éventuelle d'une seconde portée, et devraient être sacrifiés et examinés à un moment avant la fin de l'étude. Dans le cas des femelles (P), le traitement devra commencer après au moins 5 jours d'acclimatation et se poursuivre pendant au moins 2 semaines avant l'accouplement. Les femelles P devraient continuer à recevoir leur traitement quotidien durant les 3 semaines de la période d'accouplement, durant la gestation et jusqu'au sevrage des petits F_1. Des modifications du schéma de traitement peuvent être envisagées au cas où l'on disposerait d'autres informations sur la substance étudiée, comme l'induction du métabolisme ou la bio-accumulation.

Procédure d'accouplement

Dans les études de toxicité sur la fonction de reproduction, les accouplements peuvent se faire soit 1:1(1 mâle, 1 femelle) soit 1:2 (1 mâle, 2 femelles).

Dans le cas d'un accouplement 1:1, une femelle sera placée avec le même mâle jusqu'à ce qu'elle soit gravide ou que les 3 semaines se soient écoulées. On examinera les femelles chaque matin afin de relever la présence de sperme ou de bouchon vaginal. Le jour 0 de la gestation est défini comme le jour où l'on constate la présence de bouchon vaginal ou de sperme.

Tous les couples ayant failli à l'accouplement devraient être examinés afin de déterminer la cause de l'apparente stérilité.

Ceci peut impliquer des procédures qui permettent des conditions d'accouplement avec des mâles ou des femelles ayant déjà procréé, de procéder à un examen microscopique des organes de reproduction ou à un examen du cycle œstral ou de la spermatogenèse.

Taille de la portée

On laisse les animaux traités durant l'étude de fertilité mettre bas naturellement et élever librement leurs petits jusqu'au sevrage.

Quand une méthode d'homogénéisation des portées est effectuée, il est suggéré d'appliquer le programme suivant: entre le jour 1 et le jour 4 après la naissance, la taille de chaque portée peut être adaptée en éliminant, par sélection, des petits afin d'obtenir, dans toute la mesure du possible, 4 mâles et 4 femelles par portée.

Si le nombre de mâles ou de femelles ne permet pas d'obtenir 4 petits de chaque sexe par portée, un ajustement partiel peut être accepté (par exemple 5 mâles et 3 femelles). Des ajustements ne sont pas possibles pour les portées de moins de 8 petits.

▼B

Observations

Pendant toute la période d'essai, chaque animal devrait être observé au moins une fois par jour. Des modifications comportementales significatives, des signes de parturition difficile ou prolongée ainsi que tous les signes de toxicité, y compris la mortalité, devraient être enregistrés. Pendant les périodes de pré-accouplement et d'accouplement, la consommation alimentaire sera déterminée quotidiennement. Après la parturition et durant la lactation, la consommation alimentaire ainsi que la consommation d'eau lorsque la substance à tester est administrée dans l'eau de boisson devraient être déterminées le jour de la pesée des petits. Les mâles et les femelles P devraient être pesés le premier jour du traitement, puis toutes les semaines. Ces observations devraient être notées individuellement pour chaque animal adulte.

La durée de la gestation devrait être calculée à partir du jour 0 de la gravidité. Chaque portée devrait être examinée dès que possible après la naissance afin de déterminer le nombre et le sexe des petits, les mort-nés, les nouveau-nés vivants et la présence d'anomalies macroscopiques.

Les petits morts et les petits sacrifiés le quatrième jour devraient être conservés et examinés en vue de déceler d'éventuelles anomalies. Les petits vivants devraient être comptés et les portées pesées le matin qui suit la naissance ainsi que le quatrième et le septième jour, puis chaque semaine jusqu'au terme de l'étude, où les animaux devraient être alors pesés individuellement.

Les anomalies physiques ou comportementales observées chez les mères ou les petits seront enregistrées.

Pathologie

Autopsie

Au moment du sacrifice ou de la mort en cours d'étude, les animaux de la génération P devraient être soumis à un examen macroscopique afin de déceler toute anomalie structurelle ou toute modification pathologique; une attention particulière étant accordée aux organes de l'appareil de reproduction. Les petits, morts ou moribonds, seront examinés du point de vue des malformations.

Histopathologie

Les ovaires, l'utérus, le col utérin, le vagin, les testicules, l'épididyme, les vésicules séminales, la prostate, la glande coagulante, l'hypophyse et l'(les) organe(s) cible(s) de tous les animaux P seroft conservés en vue d'un examen microscopique. Au cas où ces organes n'ont pas été examinés au cours d'autres études à dose multiple, ils devraient être soumis à l'examen histologique pour tous les animaux traités à la dose élevée, tous les animaux témoins ainsi que ceux morts en cours d'expérience, lorsque c'est faisable.

Les organes présentant des anomalies chez ces animaux devraient alors être examinés chez tous les autres animaux P. Dans ce cas, l'examen microscopique sera effectué pour tous les tissus présentant des modifications pathologiques macroscopiques. Comme suggéré dans les procédures d'accouplement, les organes reproducteurs des animaux soupçonnés de stérilité seront soumis à un examen microscopique.

▼B

2. **RÉSULTATS**

Les résultats peuvent être résumés sous forme de tableaux indiquant, pour chaque groupe d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre de mâles féconds, le nombre de femelles gravides, le type de modifications et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de modification.

Lorsque c'est possible, les résultats numériques devraient être évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique reconnue peut être utilisée.

3. **RAPPORT**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

— espèce/souche utilisée,

— réponse toxique par sexe et par dose, y compris fécondité, gestation et viabilité,

— moment de la mort en cours d'expérience ou indication si l'animal était encore en vie au moment prévu pour le sacrifier à l'issue de l'étude,

— tableau présentant les poids de chaque portée, les poids moyens des petits et les poids individuels des petits à l'issue de l'étude,

— effet toxique ou autre sur la reproduction, la descendance, la croissance post-natale,

— jour de l'observation de tout signe anormal et évolution subséquente,

— poids corporel des animaux P,

— résultats d'autopsie,

— description détaillée des observations microscopiques,

— traitement statistique des résultats, quand cela est nécessaire,

— discussion des résultats,

— interprétation des résultats.

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

▼B

B.35. ÉTUDE DE TOXICITÉ POUR LA REPRODUCTION SUR DEUX GÉNÉRATIONS

1. MÉTHODE

Cette méthode est calquée sur la ligne directrice d'essai n° 416 (2001) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode d'essai relative à la toxicité pour la reproduction sur deux générations est destinée à livrer des informations générales concernant les effets d'une substance d'essai sur l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâle et femelle, notamment la fonction gonadique, le cycle œstral, le comportement à l'égard de l'accouplement, la conception, la gestation, la mise-bas, la lactation, le sevrage ainsi que la croissance et le développement de la descendance. L'étude peut aussi montrer les effets de la substance d'essai sur la morbidité et la mortalité néonatales, fournir des données préliminaires sur la toxicité prénatale et postnatale pour le développement et orienter des essais ultérieurs. Cette méthode étudie non seulement la croissance et le développement de la génération F1, mais évalue aussi l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâle et femelle, ainsi que la croissance et le développement de la génération F2. Il est possible d'obtenir des informations supplémentaires sur la toxicité pour le développement et les déficits fonctionnels en complétant le présent protocole par des études décrites dans les méthodes d'essai relatives à la toxicité pour le développement et/ou à la neurotoxicité pour le développement, ou en procédant à des études séparées à l'aide de méthodes d'essai appropriées.

1.2 PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance d'essai est administrée à différentes doses échelonnées suivant une gradation à plusieurs groupes de mâles et de femelles. On administre la substance aux mâles de la génération P (génération parentale) durant leur croissance et pendant au moins un cycle spermatogène complet (environ 56 jours chez la souris et 70 jours chez le rat) afin de mettre en évidence tous ses effets nocifs sur la spermatogenèse. Les effets sur le sperme sont déterminés d'après plusieurs paramètres, comme la morphologie et la motilité des spermatozoïdes, sur des préparations de tissus et au cours d'un examen histopathologique détaillé. Si l'on dispose de données sur la spermatogenèse provenant d'une précédente étude à doses répétées de durée suffisante, par exemple 90 jours, il n'est pas nécessaire d'inclure les mâles de la génération P dans l'évaluation. Il est toutefois recommandé de conserver des échantillons ou des enregistrements numériques du sperme de la génération P, en vue d'une évaluation ultérieure. Les femelles de la génération P doivent être traitées durant la croissance et pendant plusieurs cycles œstraux complets de manière à pouvoir détecter tous les effets nocifs de la substance d'essai sur le cycle œstral. La substance d'essai est administrée aux animaux de la génération P durant la période d'accouplement, pendant les gestations qui en résultent et jusqu'au sevrage de la descendance F1. Après le sevrage, la descendance F1 continue de recevoir la substance durant toute sa croissance et l'administration se poursuit au cours de l'accouplement et de la production de la génération F2, jusqu'au sevrage de cette dernière.

Tous les animaux subissent un examen clinique et pathologique destiné à mettre en évidence des signes de toxicité; cet examen s'attache en particulier à l'évaluation des effets sur l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâle et femelle, ainsi que sur la croissance et le développement de la descendance.

▼B

1.3 DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.3.1 **Choix des espèces**

Le rat est l'espèce qui convient le mieux à cet essai. Si on utilise une autre espèce, il faut justifier ce choix et effectuer les adaptations qui s'imposent. Les souches à faible taux de fécondité ou chez lesquelles l'incidence des anomalies du développement est notoirement élevée sont à proscrire. Au début de l'étude, la variation pondérale des animaux utilisés doit être minimale et ne doit pas dépasser 20 % du poids moyen des représentants de chaque sexe.

1.3.2 **Conditions d'encagement et d'alimentation**

L'animalerie doit être à 22 °C (+ 3 °C), avec un taux d'humidité relative d'au moins 30 % et de préférence inférieur à 70 %, sauf pendant le nettoyage de la salle, l'idéal se situant entre 50 et 60 %. On appliquera un éclairage artificiel, avec un cycle de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité. Un régime alimentaire classique pour animaux de laboratoire, avec eau potable à satiété, conviendra. Le choix des aliments sera guidé par la nécessité d'y incorporer la substance d'essai, si elle est administrée par cette voie.

Les animaux peuvent être encagés individuellement ou par petits groupes du même sexe. L'accouplement doit se dérouler dans des cages appropriées. Après constatation de la copulation, les femelles s'étant accouplées seront placées dans des cages individuelles aménagées pour la mise-bas ou la maternité. Les rates s'étant accouplées peuvent aussi être encagées par petits groupes et séparées un ou deux jours avant la mise-bas. À l'approche de la mise-bas, on leur fournira des matériaux de nidification appropriés et déterminés.

1.3.3 **Préparation des animaux**

Il convient d'utiliser de jeunes animaux sains, acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours et n'ayant pas été soumis à d'autres essais. On indiquera l'espèce, la souche, la source, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience. Il importe de connaître les liens collatéraux entre les animaux, afin de ne pas accoupler les membres d'une même fratrie. Les animaux sont répartis au hasard entre les groupes témoins et les groupes traités (il est recommandé de les regrouper par tranche de poids corporel). Les cages sont placées de manière à réduire au minimum les éventuels effets liés à leur disposition. Chaque animal est désigné par un numéro d'identification propre. Les animaux de la génération P doivent être identifiés avant le début du traitement; ceux de la génération F1 qui sont sélectionnés pour l'accouplement seront identifiés au moment du sevrage. On notera la portée d'origine de tous les animaux de la génération F1 sélectionnés. Il est également recommandé d'identifier chaque petit dès que possible après la naissance, si on envisage de les peser individuellement ou d'effectuer des essais fonctionnels.

Les animaux de la génération P seront âgés de 5 à 9 semaines au début du traitement. Tous les groupes d'essai doivent être aussi homogènes que possible quant au poids et à l'âge des animaux.

▼B

1.4. MODE OPÉRATOIRE

1.4.1. **Nombre et sexe des animaux**

Chaque groupe d'essai ou témoin doit comporter un nombre d'animaux suffisant pour que l'on puisse disposer en fin d'essai d'au moins 20 femelles gravides à terme ou presque. Pour les substances qui occasionnent des effets indésirables (stérilité, toxicité excessive à la dose élevée, par exemple), cela risque d'être impossible. Le but est d'obtenir suffisamment de femelles gravides pour pouvoir procéder à une évaluation significative de l'action de la substance étudiée sur la fertilité, la gestation, le comportement maternel et la période d'allaitement, la croissance et le développement de la descendance F1, depuis la conception jusqu'à la maturité, et sur le développement de leur descendance F2 jusqu'au sevrage. En conséquence, le fait de ne pas avoir obtenu le nombre souhaité de femelles gravides (c'est-à-dire 20) n'invalide pas nécessairement l'étude, et la situation doit être évaluée au cas par cas.

1.4.2. **Préparation des doses**

Il est recommandé d'administrer la substance d'essai par voie orale (dans la nourriture, l'eau de boisson ou par gavage) à moins qu'une autre voie (cutanée ou par inhalation) ne soit jugée plus adéquate.

S'il y a lieu, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. On recommande, si possible, d'envisager d'abord l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse, puis d'une solution ou d'une émulsion dans l'huile (par exemple l'huile de maïs) et en dernier lieu d'une solution dans d'autres véhicules. Si le véhicule n'est pas aqueux, sa toxicité doit être connue. Il faut déterminer la stabilité de la substance d'essai dans le véhicule.

1.4.3. **Dosage**

On utilise au moins trois doses différentes et un témoin en parallèle. Sauf limitations imposées par les propriétés physiques, chimiques ou biologiques de la substance d'essai, la dose la plus élevée doit faire apparaître une certaine toxicité, sans entraîner la mort ni provoquer de souffrances aiguës. En cas de mortalité inattendue, si le taux de mortalité de la génération parentale est inférieur à environ 10 pour cent, l'étude reste en générale acceptable. Il convient de choisir une série décroissante de doses afin de mettre en évidence une éventuelle relation dose-effet ainsi qu'une dose sans effets toxiques (DSET). L'écart optimal entre chaque dose de la série décroissante est généralement d'un facteur deux ou quatre, et l'adjonction d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation d'écarts trop importants (par exemple, supérieurs à un facteur dix). Si la substance d'essai est incorporée à la nourriture, l'écart entre les doses ne doit pas être supérieur à un facteur trois. Le choix des doses sera orienté par toutes les données existantes sur la toxicité, en particulier les résultats des études à doses répétées. Toute information sur le métabolisme et la cinétique de la substance d'essai ou d'un composé apparenté doit également être prise en considération. Ces informations serviront aussi à justifier l'échelle des doses.

▼B

Le groupe témoin sera un groupe non traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance d'essai, les animaux du groupe témoin seront traités de la même manière que les animaux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé. Lorsque la substance d'essai est administrée mélangée aux aliments et qu'il en résulte une diminution de la prise ou la consommation de nourriture, il peut s'avérer nécessaire d'adjoindre un groupe témoin nourri en parallèle. Les résultats d'études contrôlées destinées à évaluer les effets d'une diminution de la consommation de nourriture sur les paramètres de la reproduction peuvent remplacer l'utilisation d'un groupe témoin nourri en parallèle.

Il convient d'être attentif, le cas échéant, aux effets du véhicule ou des autres additifs sur l'absorption, la distribution, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai, aux effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai, susceptibles de modifier sa toxicité, ainsi qu'aux effets sur la consommation de nourriture ou d'eau et sur l'état nutritionnel des animaux.

1.4.4. **Essai limite**

Si un essai réalisé à une dose d'au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour administrée par voie orale ou incorporée dans la nourriture ou l'eau de boisson selon un pourcentage équivalent, conformément à la méthode décrite dans cette étude, n'entraîne pas de signes de toxicité observables chez les parents ou dans leur progéniture et qu'aucun effet toxique n'est escompté au vu des données disponibles concernant des composés présentant une structure et/ou une action métabolique analogues, il n'est pas indispensable de mener une étude complète sur plusieurs doses différentes. L'essai limite n'a pas de raison d'être lorsque le niveau d'exposition humaine implique l'utilisation d'une dose orale plus élevée. Pour d'autres modes d'administration, tels que l'inhalation ou l'application cutanée, les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai, comme sa solubilité, limitent souvent la concentration maximale applicable.

1.4.5. **Administration des doses**

Les animaux reçoivent la substance d'essai quotidiennement, sept jours sur sept. L'administration par voie orale (dans la nourriture, l'eau de boisson ou par gavage) est préférable. Si l'on opte pour un autre mode d'administration, il convient de justifier ce choix et d'apporter les modifications nécessaires, le cas échéant. On appliquera le même mode d'administration à tous les animaux, durant la période expérimentale adéquate. Si la substance d'essai est administrée par gavage, on procédera à l'aide d'une sonde gastrique. Le volume maximal de liquide administré en une seule fois ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel (0,4 ml/100 g de poids pour l'huile de maïs), sauf dans le cas des solutions aqueuses où l'on peut aller jusqu'à 2 ml/100 g de poids corporel. Sauf dans le cas de substances irritantes ou corrosives dont les effets s'intensifient généralement aux concentrations supérieures, il y a lieu de réduire au minimum la variabilité du volume d'essai en adaptant les concentrations de façon à obtenir un volume constant à toutes les doses. Dans les études par gavage, les petits ne reçoivent normalement la substance d'essai qu'indirectement, par le lait maternel, jusqu'à ce que l'administration directe débute pour eux, à partir du sevrage. Lorsque la substance d'essai est mélangée à la nourriture ou à l'eau de boisson, les petits reçoivent aussi la substance d'essai directement dès qu'ils commencent à s'alimenter seuls, lors de la dernière semaine d'allaitement.

▼B

Il est important de s'assurer que les quantités de substances administrées dans la nourriture ou l'eau de boisson n'interfèrent pas avec la nutrition ou l'équilibre hydrique. Si la substance d'essai est ajoutée à la nourriture, elle peut être administrée à concentration constante dans cette dernière (ppm) ou à dose constante par rapport au poids de l'animal; il y a lieu de préciser l'option retenue. Si l'on recourt au gavage, il faut toujours administrer la substance d'essai à peu près à la même heure chaque jour et ajuster la dose au moins une fois par semaine pour qu'elle demeure constante par rapport au poids de l'animal. Cet ajustement devra tenir compte de la diffusion placentaire.

1.4.6. **Programmes expérimentaux**

L'administration quotidienne de la substance d'essai aux mâles et aux femelles de la génération P doit débuter quand ils sont âgés de 5 à 9 semaines. Pour les mâles et les femelles de la génération F1, elle débutera au sevrage; il faut tenir compte du fait que, lorsque la substance d'essai est administrée dans la nourriture ou l'eau de boisson, il est possible que les petits de la génération F1 soient déjà exposés directement à la substance durant la période d'allaitement. Les deux sexes des générations P et F1 continueront à recevoir la substance pendant au moins 10 semaines avant la période d'accouplement. Le traitement sera poursuivi pour les deux sexes durant les deux semaines de la période d'accouplement. Les mâles qui ne serviront pas à l'évaluation des effets sur la reproduction seront euthanasiés et examinés. Les femelles de la génération P continueront à recevoir la substance d'essai tout au long de la gestation et jusqu'au sevrage de leur descendance F1. Il sera peut-être nécessaire de modifier le programme d'administration des doses à la lumière des informations disponibles sur la substance d'essai, notamment en ce qui concerne la toxicité, l'induction métabolique ou la bioaccumulation. La dose administrée à chaque animal est normalement calculée d'après les résultats de la dernière pesée de l'animal. Toutefois, la prudence s'impose lors de l'ajustement de la dose au cours du dernier tiers de la gestation.

Le traitement des mâles et des femelles P et F1 se poursuit jusqu'à leur sacrifice. Tous les adultes mâles et femelles P et F1 qui ne sont plus nécessaires pour l'évaluation des effets sur la reproduction doivent être euthanasiés. Les descendants F1 qui n'ont pas été sélectionnés pour l'accouplement et tous les descendants F2 seront euthanasiés après le sevrage.

1.4.7 **Accouplement**

1.4.7.1 *Accouplement de la génération parentale (P)*

Pour chaque accouplement, on réunira une femelle et un mâle traités à la même dose (accouplement 1:1) jusqu'à ce qu'ils aient copulé ou durant deux semaines. Les femelles subiront un examen quotidien destiné à détecter la présence de sperme ou d'un bouchon vaginal. Le jour 0 de la gestation est défini comme étant celui où l'on observe du sperme ou un bouchon vaginal. Si l'accouplement n'a pas lieu, on peut envisager de faire une deuxième tentative en réunissant les femelles avec des mâles du même groupe ayant fait leurs preuves. Les couples doivent être clairement identifiés dans les résultats. On évitera d'accoupler des membres d'une même fratrie.

▼B

1.4.7.2 *Accouplement de la génération F1*

S'agissant de l'accouplement de la génération F1, on sélectionne au moins un mâle et une femelle de chaque portée, au moment du sevrage, en vue de les accoupler avec d'autres descendants traités à la même dose, mais issus d'une autre portée, afin d'obtenir la génération F2. La sélection des petits au sein d'une même portée doit se faire au hasard s'ils ne diffèrent pas de façon significative quant au poids corporel ou à l'apparence. Si l'on constate de telles différences, on sélectionnera les meilleurs représentants de chaque portée. D'un point de vue pragmatique, il est plus facile d'opérer cette sélection en fonction du poids corporel, mais il pourrait être plus pertinent de se fonder sur l'apparence. Les descendants F1 ne doivent pas être accouplés avant d'avoir atteint leur pleine maturité sexuelle.

On évaluera les couples sans descendance afin de déterminer la cause apparente de leur stérilité. À cet effet, on pourra donner aux animaux d'autres occasions de s'accoupler avec d'autres mâles ou femelles ayant fait leurs preuves, effectuer un examen microscopique des organes reproducteurs, ou analyser les cycles œstraux ou la spermatogenèse.

1.4.7.3. *Deuxième accouplement*

Dans certains cas, notamment lorsque la taille de la portée est modifiée par le traitement ou lorsqu'un effet équivoque est observé dans le premier accouplement, on préconise d'accoupler une deuxième fois les adultes P ou F1, afin d'obtenir une deuxième portée. Il est recommandé d'accoupler une deuxième fois les mâles ou les femelles qui n'ont pas engendré de portée avec un reproducteur ou une reproductrice ayant fait ses preuves. Si la production d'une deuxième portée est jugée nécessaire, le deuxième accouplement doit avoir lieu environ une semaine après le sevrage de la dernière portée.

1.4.7.4. *Taille de la portée*

On laisse les animaux mettre bas normalement et élever leur progéniture jusqu'au sevrage. La normalisation de la taille des portées est facultative; si l'on y recourt, il faut décrire en détail la méthode utilisée.

1.5. OBSERVATIONS

1.5.1. **Observations cliniques**

Une observation clinique générale est réalisée chaque jour; en cas d'administration par gavage, l'heure à laquelle cette observation est réalisée doit tenir compte du moment où l'on prévoit que les effets atteindront leur intensité maximale après administration. On notera les changements de comportement, les signes de mise-bas prolongée ou difficile et tous les symptômes de toxicité. En outre, au moins une fois par semaine, chaque animal devra faire l'objet d'un examen plus détaillé qui pourrait être aisément réalisé à l'occasion d'une pesée de l'animal. Deux fois par jour et une fois par jour pendant le week-end, selon les besoins, on recherchera des signes de morbidité et de mortalité sur tous les animaux.

▼B

1.5.2. **Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau des animaux parents**

Les animaux parents (P et F1) sont pesés le jour de la première administration et ensuite au moins une fois par semaine. Les mères (P et F1) sont pesées au minimum aux jours 0, 7, 14, et 20 ou 21 de la gestation, puis aux mêmes jours que leurs petits durant l'allaitement, et enfin le jour de leur sacrifice. Les résultats sont consignés individuellement pour chaque animal adulte. Durant la période qui précède l'accouplement et pendant la gestation, la consommation de nourriture est mesurée au moins une fois par semaine. La consommation d'eau est relevée au moins une fois par semaine si la substance d'essai est administrée dans l'eau.

1.5.3. **Cycle œstral**

La durée et la normalité du cycle œstral sont évaluées chez les femelles P et Fl à l'aide de frottis vaginaux, avant l'accouplement, et facultativement pendant la période d'accouplement, jusqu'à constatation de preuves d'accouplement. Les cellules vaginales ou cervicales seront prélevées avec soin pour éviter d'agresser la muqueuse et d'induire ainsi une pseudogestation (1).

1.5.4. **Paramètres d'évaluation du sperme**

On note le poids des testicules et des épididymes de tous les mâles P ou F1 sacrifiés, en conservant un exemplaire de chaque organe pour l'examen histopathologique (voir paragraphes 1.5.7, 1.5.8.1). On réservera les testicules et les épididymes d'un sous-lot composé d'au moins dix mâles de chaque génération (P et F1) pour la numération des spermatides résistantes à l'homogénéisation et des spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme. Dans ce même sous-lot de mâles, on recueillera le contenu de la queue de l'épididyme ou du canal déférent en vue d'évaluer la motilité et la morphologie des spermatozoïdes. Si des effets liés au traitement sont observés ou si d'autres études révèlent que la substance peut avoir des effets sur la spermatogénèse, l'évaluation du sperme sera réalisée sur tous les mâles traités aux différentes doses; dans le cas contraire, on pourra limiter la numération aux mâles P et F1 du groupe témoin et du groupe traité à la dose la plus élevée.

Il convient de dénombrer la totalité des spermatides testiculaires résistantes à l'homogénéisation et des spermatozoïdes de la queue de l'épididyme (2) (3). Le nombre de spermatozoïdes mis en réserve dans la queue de l'épididyme peut être déduit de la concentration et du volume des spermatozoïdes dans la suspension utilisée pour compléter les évaluations qualitatives, et du nombre de spermatozoïdes récupérés après le broyage et/ou l'homogénéisation ultérieurs du tissu caudal restant. La numération doit être effectuée au sein du sous-lot de mâles sélectionnés dans les groupes traités aux différentes doses, immédiatement après le sacrifice, à moins qu'on ne réalise des enregistrements vidéo ou numériques ou qu'on ne congèle des échantillons en vue d'une analyse ultérieure. Dans ces circonstances, le groupe témoin et le groupe traité à la dose la plus élevée peuvent être analysés en premier. Si l'on n'observe pas d'effets liés au traitement (révélés par exemple par la numération, la morphologie ou la motilité des spermatozoïdes), il n'est pas nécessaire d'analyser les groupes traités aux autres doses. Si des effets liés au traitement apparaissent dans le groupe traité à la dose la plus élevée, on évaluera aussi les groupes traités aux doses plus faibles.

▼B

La motilité des spermatozoïdes dans l'épididyme ou le canal déférent est évaluée ou enregistrée sur support vidéo immédiatement après le sacrifice. Le sperme, prélevé de façon à éviter autant que possible de léser les organes, est dilué en vue de l'analyse de la motilité selon une méthode acceptable (4). Il convient d'évaluer subjectivement ou objectivement le pourcentage de spermatozoïdes devenant progressivement mobiles. Si l'on pratique une analyse du mouvement assistée par ordinateur (5) (6) (7) (8) (9) (10), la motilité progressive est évaluée d'après les seuils définis par l'utilisateur pour la vitesse moyenne de trajectoire, la rectilignité ou l'index linéaire. Si les échantillons sont enregistrés en vidéo (11) ou si les images sont enregistrées d'une autre manière au moment de l'autopsie, l'analyse subséquente pourra se limiter aux mâles P et F1 du groupe témoin et du groupe traité à la dose la plus élevée, à moins que des effets liés au traitement n'aient été observés, auquel cas il faudra aussi évaluer les groupes traités aux doses plus faibles. En l'absence d'une image vidéo ou numérique, tous les échantillons de tous les groupes traités devront être analysés lors de l'autopsie.

On procédera à une évaluation morphologique d'un échantillon de sperme de l'épididyme ou du canal déférent. Les spermatozoïdes (au moins 200 par échantillon) doivent être examinés dans des préparations fixées et en milieu liquide (12), puis classés en tant que spécimens normaux ou anormaux. Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes comprennent, par exemple, la fusion, des têtes isolées et des têtes et/ou des queues déformées. L'évaluation doit être réalisée au sein du sous-lot de mâles sélectionnés dans les groupes traités aux différentes doses, immédiatement après le sacrifice ou ultérieurement à partir des enregistrements vidéo ou numériques. Les frottis, une fois fixés, peuvent aussi être analysés à une date ultérieure. Dans ces circonstances, le groupe témoin et le groupe traité à la dose la plus élevée peuvent être analysés en premier. Si l'on n'observe pas d'effets liés au traitement (sur la morphologie des spermatozoïdes, par exemple), l'analyse des groupes traités aux autres doses devient superflue. Si des effets liés au traitement apparaissent dans le groupe traité à la plus dose élevée, il convient d'évaluer également les groupes traités aux doses plus faibles.

Si l'un des paramètres d'évaluation du sperme mentionnés plus haut a déjà été examiné dans le cadre d'une étude de toxicité systémique d'au moins 90 jours, il ne doit pas nécessairement être réévalué au cours de l'étude de la toxicité sur deux générations. Il est cependant recommandé de conserver des échantillons ou des enregistrements vidéo du sperme de la génération P, pour permettre une évaluation ultérieure si nécessaire.

1.5.5. **Descendance**

On examine chaque portée dès que possible après la mise-bas (jour 0 de l'allaitement), afin d'établir le nombre et le sexe des petits, la mortinatalité, le nombre de naissances vivantes et la présence d'anomalies macroscopiques. Les petits trouvés morts au jour 0 seront de préférence examinés, s'ils ne sont pas macérés, afin de mettre en évidence d'éventuelles anomalies et de déterminer la cause de la mort, et conservés. Les petits vivants doivent être comptés et pesés individuellement à la naissance (jour 0 de l'allaitement) ou le jour 1, et pesés régulièrement par la suite, par exemple les jours 4, 7, 14 et 21 de l'allaitement. On notera les anomalies physiques et comportementales observées chez les mères ou les petits.

▼B

Le développement physique de la descendance est consigné essentiellement sous la forme du gain de poids corporel. D'autres paramètres physiques (ouverture des oreilles et des yeux, sortie des dents, développement de la pilosité, par exemple) peuvent fournir des informations supplémentaires, mais ces observations sont de préférence réservées à l'évaluation de la maturité sexuelle (âge et poids corporel au moment de l'ouverture vaginale ou de la séparation balano-prépuciale, par exemple) (13). Il est recommandé de réaliser des explorations fonctionnelles (l'activité motrice, les fonctions sensorielles, l'ontogenèse des réflexes, par exemple) de la descendance F1 avant et/ou après le sevrage, notamment celles qui se rapportent à la maturation sexuelle, si elles ne sont pas explorées dans d'autres études. On détermine l'âge auquel sont survenus l'ouverture vaginale ou la séparation balano-prépuciale chez les descendants F1 tout juste sevrés qui ont été sélectionnés en vue de l'accouplement. Il convient de mesurer la distance ano-génitale chez les petits F2, le jour de leur naissance, si l'on a constaté une modification de la proportion de mâles et de femelles ou de l'âge de maturation sexuelle dans la génération F1.

Les observations fonctionnelles ne s'imposent plus pour les groupes présentant des signes évidents de toxicité (diminution sensible de la prise de poids, etc., par exemple). Les explorations fonctionnelles, le cas échéant, seront réalisées sur les petits non sélectionnés pour l'accouplement.

1.5.6. **Examen macroscopique**

Juste après le sacrifice ou la mort si celle-ci survient en cours d'étude, tous les animaux parents (P et F1), tous les petits qui présentent des anomalies externes ou des signes cliniques, ainsi qu'un petit/un sexe/une portée choisi(e) au hasard dans chaque génération (F1 et F2) sont soumis à un examen macroscopique destiné à révéler d'éventuels changements pathologiques ou anomalies structurelles. L'examen des organes reproducteurs doit faire l'objet d'une attention particulière. Il y a lieu d'examiner les petits moribonds qui ont été euthanasiés ainsi que les petits morts, s'ils ne sont pas macérés, afin de détecter d'éventuelles anomalies et/ou établir la cause de la mort, et de les conserver.

On examinera les utérus de toutes les femelles primipares, sans compromettre l'évaluation histopathologique, pour voir s'ils présentent des points d'implantation et les dénombrer.

1.5.7. **Pesée des organes**

Juste après le sacrifice, on détermine le poids corporel de tous les parents P et F1 ainsi que le poids des organes suivants (les deux exemplaire des organes qui vont par paires doivent être pesés séparément):

— utérus, ovaires,

— testicules, épididymes (entiers et queues),

— prostate,

— vésicules séminales avec glandes coagulantes et leurs liquides, et prostate (ensemble),

— cerveau, foie, reins, rate, hypophyse, glande thyroïde, glandes surrénales et organes cibles connus.

Les poids corporels des petits F1 et F2 retenus pour l'autopsie sont déterminés après le sacrifice, de même que le poids du cerveau, de la rate et du thymus d'un petit/un sexe/une portée choisi(e) au hasard (voir paragraphe 1.5.6).

▼B

Si possible, les résultats de l'autopsie et de la pesée des organes doivent être interprétés à la lumière des observations effectuées dans d'autres études à doses répétées.

1.5.8. **Histopathologie**

1.5.8.1. *Animaux parents*

Les organes et tissus ci-après des animaux parents (P et F1), ou des échantillons représentatifs de ces derniers, sont fixés et conservés dans un milieu approprié en vue de l'examen histopathologique.

— vagin, utérus avec col, et ovaires (conservés dans un fixateur approprié),

— un testicule (conservé dans un fixateur approprié), un épididyme, les vésicules séminales, la prostate et une glande coagulante,

— organe(s) cible(s) précédemment identifié(s) de tous les animaux P et F1 sélectionnés pour l'accouplement.

Tous les animaux P et F1 du groupe témoin et du groupe traité à la dose la plus élevée, qui ont été sélectionnés pour l'accouplement, doivent faire l'objet d'un examen histopathologique complet des organes et tissus susmentionnés. L'examen des ovaires des femelles P est facultatif. Il convient également d'examiner les organes présentant des altérations liées au traitement dans les groupes traités à la dose la plus faible et à la dose intermédiaire, afin de faciliter la détermination de la DSET. De plus, une évaluation histopathologique sera pratiquée sur les organes reproducteurs des animaux traités aux doses faibles et moyennes, chez lesquels on soupçonne une diminution de la fertilité, par exemple, ceux qui ne se sont pas accouplés, qui n'ont pas conçu, n'ont pas engendré ou n'ont pas donné naissance à des descendants sains, ou ceux chez qui on a constaté des modifications du cycle œstral ou du nombre, de la motilité ou de la morphologie des spermatozoïdes. Toutes les lésions macroscopiques telles qu'atrophies ou tumeurs doivent être examinées.

Un examen histopathologique détaillé des testicules doit être effectué (par exemple, fixation dans du liquide de Bouin, inclusion dans la paraffine et coupes transversales de 4-5 μm d'épaisseur) afin de mettre en évidence des effets liés au traitement, notamment une rétention de spermatides, l'absence de certaines couches ou types de cellules germinales, la présence de cellules géantes multinucléées ou le décollement des cellules spermatogènes dans la lumière des tubules séminifères (14). L'examen d'un épididyme intact doit porter sur la tête, le corps et la queue, ce qui peut être effectué sur une section longitudinale. On observera l'épididyme pour voir s'il ne s'y produit pas d'infiltration de leucocytes, de changement dans la fréquence des types cellulaires et de phagocytose des spermatozoïdes, et s'il ne renferme pas de cellules aberrantes. L'examen des organes reproducteurs mâles peut être effectué à l'aide d'une coloration à l'acide périodique-Schiff ou à l'hématoxyline.

Après la lactation, l'ovaire devrait contenir des follicules primordiaux et des follicules en croissance ainsi que les grands corps jaunes de la lactation. L'examen histopathologique doit révéler une déplétion qualitative de la population de follicules primordiaux. Les follicules primordiaux des femelles F1 feront l'objet d'une évaluation quantitative; le nombre d'animaux, le choix de la section ovarienne et la taille des échantillons de sections doivent être statistiquement valables pour la méthode d'évaluation employée. L'examen comprend la numération des follicules primordiaux, lesquels peuvent être combinés à de petits follicules en croissance, aux fins de la comparaison entre les ovaires des femelles traitées et témoins (15) (16) (17) (18) (19).

▼B

1.5.8.2. *Petits sevrés*

Les tissus présentant des anomalies macroscopiques et les organes cibles de tous les petits qui présentent des anomalies externes ou des signes cliniques ainsi que ceux du petit/du sexe/de la portée choisi(e) au hasard dans chaque génération (F1 et F2) et non retenu(e) pour l'accouplement seront fixés et conservés dans un milieu approprié en vue de l'examen histopathologique. La description histopathologique complète des tissus conservés sera plus particulièrement axée sur les organes reproducteurs.

2. **RÉSULTATS**

2.1 TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Les résultats obtenus sur chaque animal seront consignés et résumés sous forme de tableaux, reprenant pour chaque groupe d'essai et chaque génération, le nombre d'animaux présents au début de l'essai, le nombre d'animaux morts durant l'essai ou euthanasiés, la date de la mort ou de l'euthanasie, le nombre d'animaux fertiles, le nombre de femelles gravides, le nombre d'animaux manifestant des signes de toxicité, la description des signes de toxicité observés, notamment le moment où ils ont débuté, leur durée et leur gravité, les types d'altérations histopathologiques et toutes les données pertinentes sur la portée.

Les résultats numériques seront évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée et reconnue; le choix des méthodes statistiques doit intervenir lors de la conception de l'étude et doit être justifié. Les modèles statistiques s'appliquant aux relations «dose-effet» peuvent être utiles à l'analyse des résultats. Le rapport doit fournir suffisamment d'informations sur la méthode d'analyse et le logiciel employés, pour qu'un réviseur ou un statisticien indépendant puisse réévaluer et reconstruire l'analyse.

2.2 ÉVALUATION DES RÉSULTATS

Les résultats de cette étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations doivent être évalués en fonction des effets observés, notamment à l'autopsie et lors des examens microscopiques. L'évaluation portera sur la relation, ou l'absence de relation, entre la dose administrée de substance d'essai et la présence, la fréquence et la gravité des anomalies, notamment lésions macroscopiques, organes cibles identifiés, altération de la fertilité, anomalies cliniques, altération de la capacité de reproduction et des performances de la portée, modifications du poids corporel, effets sur la mortalité et tout autre effet toxique. Les propriétés physicochimiques de la substance d'essai et, le cas échéant, les données toxicocinétiques doivent être prises en considération lors de l'évaluation des résultats.

Une étude de toxicité pour la reproduction correctement menée doit fournir une estimation satisfaisante de la dose sans effet et permettre de comprendre les effets nocifs de la substance étudiée sur la reproduction, là parturition, l'allaitement et le développement postnatal, notamment la croissance et la maturation sexuelle.

▼B

2.3 INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Une étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations fournit des informations sur les effets d'une l'exposition répétée à une substance durant toutes les phases du cycle de reproduction. L'étude livre notamment des informations sur les paramètres de la reproduction ainsi que sur le développement, la croissance et la survie des descendants. Les résultats de l'étude doivent être interprétés à la lumière des résultats des études subchroniques, prénatales, de développement, toxicocinétiques et autres disponibles. Les résultats de la présente étude peuvent servir à apprécier la nécessité de réaliser d'autres essais sur une substance chimique. L'extrapolation des résultats de l'étude à l'homme présente un intérêt limité. Ces résultats se prêtent davantage à la détermination des concentrations sans effet et des niveaux d'exposition humaine acceptables (20) (21) (22) (23).

3. **RAPPORT**

3.1 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport doit contenir les informations suivantes:

Substance d'essai:

— nature physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques

— identification

— degré de pureté

Véhicule, le cas échéant:

— justification du choix du véhicule s'il diffère de l'eau

Animaux d'expérience:

— espèce et souche

— nombre, âge et sexe des animaux

— origine, conditions d'encagement, régime alimentaire, matériaux de nidification, etc.

— poids de chaque animal au début de l'essai

Conditions d'essai:

— justification du choix des doses

— détails concernant la formulation de la substance d'essai/son incorporation aux aliments, la concentration obtenue

— stabilité et homogénéité de la préparation;

— détails concernant l'administration de la substance d'essai;

— conversion de la concentration de la substance d'essai (ppm) dans la nourriture ou l'eau de boisson en dose administrée (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu;

— détails concernant la qualité de l'alimentation et de l'eau de boisson.

▼B

Résultats:

— consommation de nourriture, et d'eau si elle a été enregistrée, efficacité alimentaire (gain de poids corporel par gramme d'aliments consommés), et consommation de la substance d'essai par les animaux P et F1, sauf pendant la cohabitation et durant au moins le dernier tiers de la période d'allaitement;

— données sur l'absorption, le cas échéant;

— poids corporel des animaux P et F1 sélectionnés pour l'accouplement;

— données relatives aux portées et au poids des petits;

— poids corporel au moment du sacrifice et poids absolu et relatif des organes des animaux parents

— nature, gravité et durée des signes cliniques (qu'ils soient réversibles ou non);

— date de mort en cours d'étude ou animaux ayant survécu jusqu'au sacrifice;

— manifestation de la toxicité par sexe et par dose, y compris indices d'accouplement, de fécondité, de gestation, de natalité, de viabilité et d'allaitement; le rapport doit mentionner les chiffres ayant servi au calcul de ces indices;

— effets toxiques ou autres sur la reproduction, la descendance, la croissance postnatale, etc.;

— observations à l'autopsie;

— description détaillée de toutes les observations histopathologiques;

— nombre de femelles P et F1 ayant un cycle normal et durée du cycle;

— nombre total de spermatozoïdes dans la queue de l'épididyme, pourcentage de spermatozoïdes progressivement mobiles, pourcentage de spermatozoïdes à morphologie normale et pourcentage de spermatozoïdes par anomalie identifiée;

— temps écoulé jusqu'à l'accouplement, exprimé en nombre de jours;

— durée de la gestation;

— nombre d'implantations, de corps jaunes, taille de la portée;

— nombre de naissances vivantes et de pertes postimplantatoires;

— nombre de petits affectés d'anomalies macroscopiques; nombre de rabougris s'il a été déterminé;

— paramètres physiques évalués sur les petits et autres données sur le développement postnatal; il y a lieu de justifier les paramètres physiques évalués;

— observations fonctionnelles réalisées sur les petits et sur les adultes, suivant le cas;

— traitement statistique des résultats, le cas échéant.

▼B

Discussion

Conclusions, y compris valeurs de la DSET pour les effets sur la mère et sur les petits.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals:* I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

(2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12:92-108.

(3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:103-107.

(4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5:39 44

(5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog:a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3):237- 244.

(6) Chapin, R.E. et al, (1992). Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6:267-273

(7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an In Vitro Demonstration. *Journal of Andrology* 13:409-421.

(8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologie Considerations. *Reproductive Toxicology* 5:449-458.

(9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology*, Part A., Academie, Orlando, Florida. pp. 319-333.

(10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologie and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10: 401-415.

(11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility, Journal of Andrology 8:330-337.

(12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints pf Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6:491-505.

(13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17:298303.

(14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

(16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-426.

(17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

(18) Smith, B.J. et al,. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5:379-383.

(19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston,. and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

(20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

(21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

(22) Palmer, A.K. (1981). In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

(23) Palmer, A.K. (1978). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼**M4**

B.36. **TOXICOCINÉTIQUE**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 417 (2010) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les études portant sur la toxicocinétique d'une substance chimique d'essai ont pour objet de fournir des informations adéquates sur l'absorption, la distribution, la biotransformation (c'est-à-dire le métabolisme) et l'excrétion de cette substance, de faciliter l'établissement d'une relation entre la concentration ou la dose et la toxicité observée, et d'aider à comprendre le mécanisme de toxicité. La toxicocinétique peut aider à comprendre les études de toxicologie en démontrant que l'exposition des animaux d'expérience à la substance d'essai est de nature systémique, et en révélant quels sont les éléments circulants (substance mère/métabolites). Les principaux paramètres toxicocinétiques tirés de ces études fourniront également des renseignements sur le potentiel d'accumulation de la substance d'essai dans les tissus et/ou organes, et sur le risque d'induction d'une biotransformation sous l'effet d'une exposition à cette substance.

2. Les données toxicocinétiques peuvent aider à évaluer l'adéquation et la pertinence des données de toxicité animale, à des fins d'extrapolation des dangers pour l'homme et/ou d'évaluation des risques. De plus, les études de toxicocinétique peuvent apporter des informations utiles pour déterminer les doses à utiliser dans les études de toxicité (cinétique linéaire vs non linéaire), et les effets liés à la voie d'administration, la biodisponibilité et autres aspects relatifs à la conception de l'étude. Certains types de données toxicocinétiques peuvent servir à élaborer des modèles toxicocinétiques à base physiologique (TCBP).

3. Les données sur la toxicocinétique et le métabolisme présentent de l'intérêt à plusieurs titres. Elles peuvent notamment indiquer les toxicités et modes d'action éventuels, ainsi que leur relation aux doses et à la voie d'exposition. En outre, les données sur le métabolisme peuvent apporter des informations utiles pour évaluer l'importance, sur le plan toxicologique, de l'exposition à des métabolites exogènes de la substance d'essai.

4. Des données toxicocinétiques adéquates aideront à confirmer l'acceptabilité et l'applicabilité des méthodes fondées sur les relations quantitatives structure-activité, les prévisions à partir de données croisées sur de substances analogues ou le regroupement des substances pour évaluer la sécurité des substances chimiques. Les données de cinétique peuvent aussi servir à évaluer la pertinence toxicologique d'autres études (par exemple in vivo/in vitro).

5. Sauf mention contraire (voir en particulier les paragraphes 74 à 78), la présente méthode d'essai suppose l'administration orale de la substance d'essai.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

6. Les régimes réglementaires ont des exigences et des besoins différents quant aux effets et paramètres toxicocinétiques à mesurer pour différentes classes de produits chimiques (par exemple pesticides, biocides, produits industriels). Contrairement à la plupart des autres, la présente méthode d'essai décrit des essais de toxicocinétique impliquant des mesures et des effets observés multiples. À l'avenir, plusieurs nouvelles méthodes d'essai et/ou document(s) d'orientation pourraient être élaborés pour décrire séparément et plus en détail chaque effet mesuré. Dans le cas de la présente méthode d'essai, ce sont les exigences et/ou besoins de chaque dispositif réglementaire qui déterminent les essais ou l'évaluation à mettre en œuvre.

▼M4

7. De nombreuses études peuvent être réalisées pour évaluer à des fins réglementaires le comportement toxicocinétique d'une substance d'essai. Néanmoins, en fonction des besoins ou des situations réglementaires particulières, toutes ces études ne sont pas nécessaires à l'évaluation d'un produit. Dans la conduite des études de toxicocinétique, il faut faire preuve de souplesse et prendre en considération les caractéristiques de la substance d'essai. Dans certains cas, l'étude d'une série précise de questions peut suffire à cerner les dangers et les risques associés à la substance d'essai. Parfois, les données toxicocinétiques peuvent être collectées dans le cadre d'une évaluation relevant d'autres études toxicologiques. Dans d'autres cas, il peut être nécessaire de réaliser des études de toxicocinétique supplémentaires et/ou plus approfondies, si la réglementation en vigueur l'exige et/ou lorsque l'évaluation de la substance d'essai soulève de nouvelles interrogations.

8. Avant de lancer une étude, et pour en améliorer la qualité et éviter une utilisation non nécessaire d'animaux, le laboratoire d'essai prend en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai et sur ses métabolites et analogues pertinents. Parmi ces informations pourront figurer des données obtenues grâce à d'autres méthodes d'essai appropriées (études in vivo, in vitro, et/ou évaluations in silico). Les propriétés physico-chimiques, comme le coefficient de partage octanol-eau (log P_{OE}), le pKa, l'hydrosolubilité, la pression de vapeur et le poids moléculaire d'un produit chimique, peuvent être utiles pour planifier l'étude et interpréter ses résultats. Les méthodes décrites à cet effet dans les différentes méthodes d'essai permettront de les déterminer

LIMITATIONS

9. La présente méthode d'essai ne vise pas les cas particuliers, comme les femelles gravides ou en lactation et leur progéniture, ni l'évaluation de la présence éventuelle de résidus chez des animaux exposés servant à l'alimentation. Néanmoins, les données obtenues à l'issue d'une étude menée selon la méthode B.36 peuvent fournir des informations susceptibles d'orienter la conception d'études spécifiques sur ces sujets. La présente méthode d'essai n'est pas destinée aux essais de nanomatériaux. L'examen préliminaire des Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques en vue d'évaluer leur applicabilité aux nanomatériaux indique en effet que la ligne directrice 417 (équivalente à la présente méthode d'essai) peut ne pas s'appliquer à ces derniers (1).

DÉFINITIONS

10. Les définitions utilisées aux fins de la présente méthode d'essai figurent en appendice.

CONSIDÉRATIONS RELATIVES AU BIEN-ÊTRE DES ANIMAUX

11. On trouvera dans le document d'orientation de l'OCDE n° 19 (2) des indications concernant le traitement éthiquement acceptable des animaux. La consultation de ce document est recommandée pour toutes les études in vivo et in vitro décrites dans la présente méthode d'essai.

DESCRIPTION DES MÉTHODES

Études pilotes

12. Pour le choix des paramètres expérimentaux s'appliquant aux études de toxicocinétique (par exemple métabolisme, bilan massique, protocoles analytiques, dosage, exhalation de CO_2, etc.), il est recommandé et conseillé de recourir à des études pilotes. La caractérisation de ces paramètres ne nécessite pas systématiquement l'emploi de substances radiomarquées.

▼M4

Sélection des animaux

Espèces

13. Les espèces (et souches) animales utilisées pour les essais de toxicocinétique sont de préférence les mêmes que celles employées dans d'autres études toxicologiques réalisées avec la substance d'essai concernée. C'est normalement le rat qui est retenu, puisque les études toxicologiques l'utilisent massivement. Le recours à d'autres espèces, à la place ou en complément, est légitime si des études toxicologiques majeures indiquent des effets toxiques significatifs sur ces espèces, ou s'il est démontré que le comportement de ces dernières en termes de toxicité/toxicocinétique est plus pertinent pour l'homme. Il conviendra de justifier le choix de l'espèce animale et de la souche.

14. Sauf mention contraire, la présente méthode d'essai suppose le rat comme espèce d'essai. Certains aspects de cette méthode d'essai pourraient devoir être modifiés en cas de recours à une autre espèce.

Âge et souche

15. Il convient d'employer de jeunes animaux adultes en bonne santé, âgés normalement de 6 à 12 semaines au moment de l'administration de la dose (voir également les paragraphes 13 et 14). L'utilisation d'animaux autres que des jeunes adultes fait l'objet de justification. Tous les animaux ont à peu près le même âge au début de l'étude. Les écarts de poids entre individus ne dépassent pas ± 20 % du poids moyen du groupe d'essai. Idéalement, la souche utilisée est la même que celle employée pour constituer la base de données toxicologiques concernant la substance d'essai.

Nombre et sexe des animaux

16. Pour chaque dose testée, au minimum quatre animaux de même sexe sont utilisés. Il convient de justifier le sexe des animaux employés. L'utilisation d'animaux des deux sexes (quatre mâles et quatre femelles) est envisagée s'il existe des éléments attestant de différences de toxicité notables en fonction du sexe.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

17. Les animaux sont en général placés dans des cages individuelles pendant la période d'essai. L'encagement collectif se justifie dans des circonstances particulières. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. La température de l'animalerie d'expérience est de 22 °C (± 3 °C) et l'humidité relative de 30 à 70 %. L'alimentation pourra comporter une nourriture classique de laboratoire et de l'eau à satiété.

Substance d'essai

18. Une substance d'essai radiomarquée au ^{14}C est utilisée pour tous les aspects de l'étude concernant le bilan massique et l'identification des métabolites; néanmoins, s'il peut être démontré:

— qu'il est possible d'évaluer correctement le bilan massique et de procéder à l'identification des métabolites à l'aide d'une substance d'essai non marquée, et

— que la spécificité et la sensibilité analytiques de la méthode utilisant une substance d'essai non radioactive sont égales ou supérieures à celles qu'on obtiendrait avec une substance radiomarquée,

▼M4

alors il n'est pas nécessaire de recourir à une substance d'essai radiomarquée. Par ailleurs, d'autres isotopes radioactifs et stables peuvent être employés, en particulier si l'élément en question cause la toxicité ou fait partie de la portion toxique de la substance d'essai. Si possible, le marqueur radioactif se situe dans une portion centrale métaboliquement stable (c'est-à-dire qui n'est pas échangeable, n'est pas éliminée par métabolisme sous forme de CO_2, et n'est pas incorporée dans l'ensemble des radicaux monocarbonés de l'organisme) de la molécule. Le marquage de sites multiples ou de régions spécifiques de la molécule peut être nécessaire pour suivre le devenir métabolique de la substance d'essai.

19. Les substances d'essai radiomarquées et non radiomarquées sont analysées à l'aide de méthodes appropriées permettant d'établir leur pureté et leur identité. La radiopureté de la substance d'essai radioactive est la meilleure qu'on puisse obtenir pour une substance donnée (dans l'idéal, elle est supérieure à 95 %) et un effort raisonnable est fourni pour identifier les impuretés présentes à hauteur de 2 % ou plus. La pureté ainsi que l'identité et la proportion des éventuelles impuretés identifiées sont incluses dans le rapport d'essai. Certains programmes réglementaires peuvent choisir de fournir des orientations supplémentaires pour aider à définir et à spécifier les substances d'essai composées de mélanges, ainsi que les méthodes de détermination de la pureté.

Choix des doses

Étude pilote

20. Le plus souvent, une dose orale unique suffit pour l'étude pilote. La dose est non toxique, mais suffisamment élevée pour permettre l'identification des métabolites dans les excréta (et, le cas échéant, dans le plasma), ainsi que pour remplir l'objectif assigné à l'étude pilote au paragraphe 12 de la présente méthode d'essai.

Études principales

21. Pour les études principales, il est préférable d'administrer un minimum de deux doses, car les informations réunies à partir d'au moins deux groupes de dose peuvent faciliter la détermination des doses pour d'autres études de toxicité, ainsi que l'évaluation de la relation dose-effet d'essais de toxicité déjà disponibles.

22. Lorsque deux doses sont administrées, elles sont toutes deux suffisamment élevées pour permettre l'identification des métabolites dans les excréta (et, le cas échéant, dans le plasma). Les informations tirées des études de toxicité disponibles sont prises en compte pour le dosage. Si l'on ne dispose pas d'informations (provenant, par exemple, d'études de toxicité orale aiguë indiquant des signes cliniques de toxicité, ou d'études de toxicité par doses répétées), on peut envisager pour la dose la plus élevée une valeur inférieure à l'estimation de la DL_{50} (voies orale et cutanée) ou de la CL_{50} (voie par inhalation), ou inférieure à la valeur basse de la plage des estimations de toxicité aiguë. La dose la plus faible correspondra à une fraction de la dose la plus élevée.

23. Si un seul dosage est utilisé, la dose est idéalement suffisamment élevée pour permettre l'identification des métabolites dans les excréta (et, le cas échéant, dans le plasma), sans pour autant produire de toxicité apparente. Il convient de justifier la décision de ne pas inclure un second niveau de dose.

24. Si l'on a besoin de déterminer l'effet de la dose sur les processus cinétiques, deux doses peuvent ne pas suffire et il convient qu'au moins une dose soit assez élevée pour saturer ces processus. Si l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps [*area under the plasma concentration- time curve*] (AUC) ne varie pas de façon linéaire entre deux niveaux de dose utilisés dans l'étude principale, on peut en déduire que la saturation d'un ou de plusieurs des processus cinétiques s'opère quelque part entre ces deux niveaux de dose.

▼M4

25. Pour les substances d'essai faiblement toxiques, il convient d'employer une dose maximale de 1 000 mg/kg de poids corporel (voies orale et cutanée) – si l'administration se fait par inhalation, se référer au chapitre B.2 de la présente annexe; généralement la dose n'excédera pas 2 mg/l. Des considérations spécifiques au produit peuvent rendre nécessaire une dose supérieure, en fonction des besoins réglementaires. Le choix des doses fait toujours l'objet d'une justification.

26. Les données relatives à la toxicocinétique ou à la distribution tissulaire fondées sur une dose unique peuvent convenir pour déterminer le potentiel d'accumulation et/ou de persistance. Néanmoins, dans certaines circonstances, l'administration de doses répétées peut être nécessaire i) pour mieux évaluer le potentiel d'accumulation et/ou de persistance, ou l'évolution des paramètres toxicocinétiques (par exemple induction et inhibition enzymatiques), ou ii) pour répondre aux exigences du dispositif réglementaire en vigueur. Dans les études à doses répétées, si l'administration de doses faibles suffit généralement, il peut parfois s'avérer nécessaire d'administrer des doses élevées (voir également le paragraphe 57).

Administration de la substance d'essai

27. La substance d'essai est dissoute ou mise en suspension homogène dans le même véhicule que celui employé pour les autres études de toxicité par gavage oral réalisées avec la substance d'essai, si des informations sont disponibles à ce sujet. Le choix du véhicule fait l'objet d'une justification. Le choix du véhicule et le volume de dosage sont pris en compte lors de la conception de l'étude. La méthode d'administration classique est le gavage; néanmoins, l'administration de la substance dans une capsule de gélatine ou mélangée à la nourriture peut être avantageuse dans certaines situations (dans les deux cas, le choix fait l'objet d'une justification). Il convient en outre de vérifier la dose effectivement administrée à chaque animal.

28. Le volume maximal de liquide à administrer par gavage oral en une seule fois dépend de la taille des animaux d'expérience, du type de véhicule de dosage, et de la suppression ou du maintien de la nourriture avant l'administration de la substance d'essai. La décision de maintenir ou de restreindre l'alimentation avant l'administration de la dose fait l'objet d'une justification. Normalement, le volume est aussi faible que possible, que le véhicule employé soit aqueux ou non. Pour les rongeurs, le volume de dose ne dépasse pas normalement 10 ml/kg de poids corporel. Dans le cas de substances d'essai plus lipophiles, les volumes de véhicule utilisés peuvent être de 4 ml/kg de poids corporel ou plus. En cas de doses répétées, si le jeûne quotidien est contre-indiqué, il faut envisager des volumes de dose plus faibles (par exemple de 2 à 4 ml/kg de poids corporel). Si possible, l'utilisation de volumes de dose en accord avec ceux utilisés pour la substance d'essai dans des études orales par gavage est envisagée.

29. L'administration de la substance d'essai en intraveineuse (IV) et sa mesure dans le sang et/ou les excréta peuvent servir à déterminer la biodisponibilité ou l'absorption orale relative. Pour ce type d'étude, une dose unique de la substance d'essai (généralement équivalente, mais non supérieure, à la dose orale la plus faible – voir «Choix des doses») est administrée à l'aide d'un véhicule approprié. Cette dose est administrée dans un volume idoine (par exemple 1 ml/kg de poids corporel) et au site choisi, à au moins quatre animaux du sexe approprié (des animaux des deux sexes peuvent être employés s'il y a lieu, voir paragraphe 16). L'administration intraveineuse de la substance d'essai suppose de préparer une dose intégralement dissoute ou mise en suspension. On fera en sorte que le véhicule choisi pour cette administration n'interfère pas avec le flux sanguin ou l'intégrité des cellules

▼M4

sanguines. Si la substance d'essai est perfusée, la vitesse de perfusion est consignée et normalisée pour tous les animaux, à condition qu'une pompe à perfusion soit utilisée. Il convient de recourir à l'anesthésie en cas de canulation de la veine jugulaire (pour administrer la substance d'essai et/ou faire un prélèvement sanguin) ou si l'on utilise l'artère fémorale pour l'administration. Le type d'anesthésie est mûrement réfléchi, car il peut avoir des conséquences toxicocinétiques. Les animaux doivent pouvoir se rétablir avant que la substance d'essai et le véhicule leur soient injectés.

30. D'autres voies d'administration, comme la voie cutanée et l'inhalation (voir paragraphes 74 à 78) peuvent également convenir pour certaines substances d'essai, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et des conditions d'utilisation ou de la voie d'exposition humaine prévisibles.

Mesures

Bilan massique

31. Le bilan massique est déterminé par la somme du pourcentage de la dose (radioactive) administrée excrétés dans l'urine, les fèces et l'air expiré, et du pourcentage présent dans les tissus, la carcasse résiduelle, et le liquide de lavage de la cage (voir paragraphe 46). En général, une récupération totale de plus de 90 % de la substance d'essai (radioactivité) administrée est considérée comme satisfaisante.

Absorption

32. Une estimation initiale de l'absorption peut être réalisée en excluant du bilan massique le pourcentage de la dose retrouvé dans le tractus gastro-intestinal et/ou dans les fèces. Pour le calcul du pourcentage d'absorption, voir le paragraphe 33. Pour l'analyse des excréta, voir les paragraphes 44 à 49. Si l'importance exacte de l'absorption faisant suite à l'administration d'une dose orale ne peut être établie à partir des études de bilan massique (par exemple, lorsque plus de 20 % de la dose administrée est présente dans les fèces), des explorations plus poussées peuvent être nécessaires. Elles peuvent comprendre soit 1) l'administration orale de la substance d'essai et la mesure de sa présence dans la bile, soit 2) l'administration orale et intraveineuse de la substance d'essai, et la mesure de la quantité nette de substance présente dans l'urine, plus dans l'air expiré, plus dans la carcasse pour chacune de ces deux voies. Dans les deux cas, la mesure de la radioactivité est utilisée comme méthode de substitution à l'analyse spécifique de la substance d'essai et de ses métabolites.

33. Pour étudier l'excrétion biliaire, on administre généralement la substance d'essai par voie orale. Dans ce type d'étude, les voies biliaires d'au moins quatre animaux du sexe approprié (ou des deux sexes le cas échéant) sont canulées et une dose unique de la substance d'essai est administrée. Après l'administration, il convient de surveiller aussi longtemps que nécessaire l'excrétion de radioactivité/substance d'essai dans la bile, afin d'estimer le pourcentage de la dose administrée excrété par cette voie, ce qui peut ensuite servir à calculer l'ampleur de l'absorption orale, de la manière suivante:

$$\text{Pourcentage d'absorption} = \begin{array}{l}(\text{quantités présentes dans la bile} + \text{l'urine} + \text{l'air expiré} \\ + \text{la carcasse hors tractus gastro} - \text{intestinal})/ \\ \text{quantité administrée} \times 100\end{array}$$

34. Pour certaines classes de substances d'essai, une sécrétion directe de la dose absorbée peut avoir lieu au travers des membranes intestinales. Dans ce cas, la mesure du pourcentage de la dose présent dans les fèces après administration orale chez un rat aux voies biliaires canulées n'est pas jugée représentative de la dose non absorbée. Il est recommandé, si on prévoit une sécrétion intestinale, de calculer le pourcentage de la dose absorbé en estimant l'absorption par comparaison de l'excrétion après administration par voie orale et par voie intraveineuse (rat intact ou à voies biliaires canulées) (voir paragraphe 35). Il est également conseillé, quand la quantification de la sécrétion intestinale est jugée nécessaire, de mesurer l'excrétion chez le rat à voies biliaires canulées après administration intraveineuse de la dose.

▼M4

Biodisponibilité

35. Il est possible de déterminer la biodisponibilité à partir de la cinétique plasmatique/sanguine des groupes oraux et IV, comme décrit aux paragraphes 50 à 52, par une analyse spécifique de la substance d'essai et/ou de son (ses) métabolite(s) pertinent(s), c'est-à-dire sans qu'il soit besoin de recourir à une substance d'essai radiomarquée. Le calcul de la biodisponibilité (F) de la substance d'essai ou de son (ses) métabolite(s) pertinents s'effectue alors comme suit:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dose_{IV}/Dose_{exp})$$

où AUC est l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps et exp la voie d'administration (orale, cutanée ou par inhalation).

36. Afin d'évaluer les risques liés aux effets systémiques, on préfère généralement utiliser la biodisponibilité du composant toxique plutôt que le pourcentage d'absorption pour comparer les concentrations systémiques provenant d'études animales avec des données analogues de surveillance biologique tirées d'études sur l'exposition des travailleurs. La situation peut se complexifier si les doses se situent dans la plage non linéaire, aussi importe-t-il que l'étude de toxicocinétique détermine des doses dans la plage linéaire.

Distribution tissulaire

37. Connaître la distribution tissulaire d'une substance d'essai et/ou de ses métabolites est important pour identifier les tissus cibles, comprendre les mécanismes de toxicité à l'œuvre et obtenir des informations sur le potentiel d'accumulation et de persistance de la substance d'essai et de ses métabolites. Le pourcentage de dose (radioactive) totale dans les tissus et dans la carcasse résiduelle est mesuré au minimum à la fin de l'étude d'excrétion (par exemple normalement 7 jours après le dosage ou moins en fonction du comportement spécifique de la substance d'essai). Lorsque aucune substance d'essai n'est détectée dans les tissus à la fin de l'étude (par exemple parce que la substance peut avoir été éliminée avant la fin de l'étude en raison d'une courte demi-vie), il convient de prendre soin de ne pas mal interpréter les données. Dans ce type de situation, la distribution tissulaire est examinée au moment du pic de concentration plasmatique/sanguine (T_{max}) ou au maximum du taux d'excrétion urinaire de la substance d'essai (et/ou de ses métabolites) selon le cas, (voir paragraphe 38). De plus, il se peut que la collecte de tissues à d'autres moments soit nécessaire pour évaluer la variation de la distribution en fonction du temps (s'il y a lieu), pour aider à établir le bilan massique, et/ou si une autorité compétente l'exige. Parmi les tissus à prélever figurent le foie, la graisse, le tractus gastro-intestinal, le rein, la rate, le sang total, la carcasse résiduelle, les tissus des organes cibles et tout autre tissu potentiellement intéressant pour l'évaluation toxicologique de la substance d'essai, par exemple thyroïde, hématies, organes reproducteurs, peau, œil (en particulier pour les animaux pigmentés). On envisagera d'analyser un plus large éventail de tissus aux mêmes moments afin d'optimiser l'utilisation des animaux et si des études de toxicité chronique ou subchronique mettent en évidence une toxicité pour certains organes cibles. Il convient également de consigner la concentration du résidu (radioactif) et les ratios tissu-plasma (sanguin).

38. Il est possible que l'évaluation de la distribution tissulaire à d'autres moments, tels qu'aux moments du pic de concentration plasmatique/sanguine (par exemple T_{max}) ou au maximum du taux d'excrétion urinaire, obtenue à partir des études de cinétique plasmatique/sanguine ou d'excrétion respectivement, soit aussi nécessaire ou exigée par une autorité compétente. Cette information peut être utile pour comprendre la toxicité et le potentiel d'accumulation et de persistance de la substance d'essai et des métabolites. Le choix des éléments à prélever fait l'objet d'une justification; les prélèvements destinés à être analysés sont généralement les mêmes que ceux énumérés au paragraphe 37.

▼**M4**

39. Pour les études sur la distribution tissulaire, il est possible de quantifier la radioactivité en procédant à la dissection, l'homogénéisation, la combustion et/ou la solubilisation des organes, puis à un comptage par scintillation liquide des résidus piégés. Certaines techniques, actuellement à différents stades de développement, notamment l'autoradiographie quantitative du corps entier et l'autoradiographie microscopique des récepteurs, peuvent s'avérer utiles pour déterminer la distribution d'une substance d'essai dans les organes et/ou les tissus (3) (4).

40. Pour les voies d'administration autres que la voie orale, on prélève et analyse des tissus spécifiques, comme les poumons dans les études par inhalation ou la peau dans les études par voie cutanée. Voir les paragraphes 74 à 78.

Métabolisme

41. On recueille les excréta (et, le cas échéant, le plasma) afin d'identifier et de quantifier la substance d'essai et ses métabolites, non modifiés, selon la méthode indiquée aux paragraphes 44 à 49. Il est acceptable de regrouper les excréta pour faciliter l'identification des métabolites au sein d'un groupe de dose donné. Il est recommandé d'établir le profil des métabolites à chaque période de l'étude. Néanmoins, si l'absence d'échantillons ou de radioactivité empêche de le faire, il est acceptable de regrouper l'urine et les fèces recueillies à différents moments, mais provenant uniquement d'animaux du même sexe ayant reçu la même dose. Des méthodes qualitatives et quantitatives appropriées sont mises en œuvre pour étudier l'urine, les fèces et la radioactivité expirée par les animaux traités, ainsi que la bile, le cas échéant.

42. Un effort raisonnable est fait pour identifier tous les métabolites présents à hauteur de 5 % ou plus de la dose administrée et pour fournir un schéma métabolique de la substance d'essai. Il convient d'identifier les substances d'essai ayant été caractérisées, dans les excréta, comme comprenant 5 % ou plus de la dose administrée. L'identification équivaut à la détermination exacte de la structure des composants. Habituellement, l'identification est réalisée en soumettant simultanément à une chromatographie le métabolite et des étalons connus, en utilisant deux systèmes différents, ou grâce à des techniques à même de fournir une identification structurale positive, par exemple spectrométrie de masse, résonance magnétique nucléaire (RMN), etc. Dans le cas d'une co-chromatographie, il faut éviter d'utiliser des techniques chromatographiques employant la même phase stationnaire avec deux systèmes de solvants différents pour vérifier l'identité de métabolites, car alors les méthodes ne sont pas indépendantes. L'identification par co-chromatographie fait usage de deux systèmes dissemblables, analytiquement indépendants, par exemple une chromatographie sur couche mince (CCM) à phase inversée et une CCM à phase normale, ou une CCM et une chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Du moment que la qualité de la séparation chromatographique est acceptable, aucune confirmation supplémentaire par spectroscopie n'est demandée. Les méthodes qui apportent des informations structurales, telles que la chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse (CG-SM), la chromatographie liquide/spectrométrie de masse (CL-SM), ou la chromatographie liquide/spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) et la spectrométrie par RMN, peuvent également fournir une identification non ambiguë.

43. S'il est impossible d'identifier les métabolites présents à hauteur de 5 % ou plus de la dose administrée, il convient de le justifier ou de l'expliquer dans le rapport final. Il peut être avisé d'identifier les métabolites représentant moins de 5 % de la dose administrée, afin de mieux comprendre la voie métabolique en vue d'évaluer les dangers et/ou les risques liés à la substance d'essai. Une confirmation de la structure de ces métabolites est autant que possible fournie. Pour cela, il pourra être nécessaire d'établir leur profil dans le plasma, le sang ou d'autres tissus.

▼M4

Excrétion

44. Le taux et l'importance de l'excrétion de la dose administrée sont déterminés par la mesure du pourcentage de la dose (radioactive) retrouvé dans l'urine, les fèces et l'air expiré. Ces données aideront également à établir le bilan massique. Les quantités de substance d'essai (radioactivité) éliminées dans l'urine, les fèces et l'air expiré sont évaluées à des intervalles de temps appropriés (voir les paragraphes 47 à 49). Les expériences à doses répétées sont conçues de manière à permettre d'obtenir des données sur l'excrétion, afin de remplir les objectifs définis au paragraphe 26. On pourra ainsi effectuer des comparaisons avec les expériences à dose unique.

45. Si une étude pilote montre que la substance d'essai (radioactivité) n'est pas excrétée en quantités significatives (voir paragraphe 49) dans l'air expiré, il ne sera pas nécessaire de collecter celui-ci dans le cadre de l'étude définitive.

46. Chaque animal est placé, pour la collecte des excréta (urine, fèces et air expiré), dans une unité individuelle d'étude du métabolisme. À la fin de chaque période de collecte (voir paragraphes 47 à 49), ces unités sont rincées à l'aide d'un solvant approprié (lavage de la cage) pour assurer une récupération maximale de la substance d'essai (radioactivité). La collecte des excréta s'achève au bout de 7 jours, ou après récupération, avant ce délai, d'au moins 90 % de la dose administrée.

47. La quantité totale de substance d'essai (radioactivité) dans l'urine est déterminée à deux moments au moins de la première journée de collecte, dont une fois 24 h après l'administration de la dose, puis quotidiennement jusqu'à la fin de l'étude. Il est recommandé de retenir plus de deux points d'échantillonnage pendant la première journée (par exemple, 6 h, 12 h et 24 h après l'administration de la dose). Les résultats des études pilotes sont analysés afin d'obtenir des informations sur les moments de collecte alternatifs ou supplémentaires à mettre en œuvre. Le calendrier de collecte fait l'objet d'une justification.

48. La quantité totale de substance d'essai (radioactivité) dans les fèces est déterminée quotidiennement, 24 h après l'administration de la dose et jusqu'à la fin de l'étude, sauf si les études pilotes suggèrent d'effectuer des prélèvements plus fréquents ou à d'autres moments. Dans ce cas, une justification est fournie.

49. La collecte du CO_2 expiré et d'autres produits volatils peut être interrompue dans une étude donnée quand on retrouve moins de 1 % de la dose administrée dans l'air exhalé pendant 24 h de collecte.

Études en fonction du temps

Cinétique sanguine/plasmatique

50. Ces études visent à estimer les principaux paramètres toxicocinétiques [par exemple C_{max}, T_{max}, demi-vie ($t_{1/2}$), AUC] concernant la substance d'essai. Elles peuvent se mener à dose unique, mais impliquent généralement deux doses ou plus. Le dosage est à définir en fonction de la nature de l'expérience et/ou de la question étudiée. Des données cinétiques peuvent être nécessaires pour résoudre des questions comme la biodisponibilité de la substance d'essai et/ou déterminer l'effet de la dose sur l'élimination (c'est-à-dire pour établir si la saturation de l'élimination dépend ou non de la dose).

51. Pour ce type d'étude, il convient d'utiliser au moins quatre animaux du même sexe par groupe de dose. Le choix du sexe des animaux employés fait l'objet d'une justification. L'utilisation d'animaux des deux sexes (quatre mâles et quatre femelles) est envisagée s'il existe des éléments attestant de différences de toxicité notables en fonction du sexe.

▼M4

52. Après l'administration de la substance d'essai (radiomarquée), il convient de prélever des échantillons de sang sur chaque animal, à des moments et selon une méthode appropriés. Le volume et le nombre des échantillons sanguins prélevés par animal sont susceptibles d'être limités par les effets éventuels de prélèvements répétés sur la santé/la physiologie des animaux et/ou par la sensibilité de la méthode analytique. Les échantillons seront analysés séparément pour chaque animal. Dans certaines circonstances (par exemple caractérisation des métabolites), il peut être nécessaire de regrouper les échantillons prélevés sur plusieurs animaux. Ces échantillons regroupés sont clairement identifiés, et le regroupement fait l'objet d'une explication. Si une substance d'essai radiomarquée est utilisée, il peut y avoir lieu d'analyser la radioactivité totale. Dans ce cas, l'analyse est effectuée dans le sang total et le plasma, ou dans le plasma et les globules rouges, pour permettre de calculer le rapport sang/plasma. Dans d'autres circonstances, il peut être nécessaire de procéder à une étude plus approfondie requérant l'identification du composé parent et/ou de ses métabolites, ou d'évaluer la fixation aux protéines.

Autres études de cinétique tissulaire

53. Ces études ont pour objet d'obtenir des informations sur l'évolution dans le temps afin de répondre à des questions liées notamment au mode d'action toxique, à la bioaccumulation et à la biopersistance en déterminant la concentration de la substance d'essai dans différents tissus. Le choix des tissus et le nombre de points temporels évalués dépendront de l'aspect étudié et de la base de données toxicologiques disponible sur la substance d'essai. Pour concevoir ces études de cinétique tissulaire complémentaires, il convient de tenir compte des informations recueillies décrites aux paragraphes 37 à 40. Ces études peuvent nécessiter un dosage unique ou un dosage répété. La méthode retenue fait l'objet d'une justification détaillée.

54. Des études de cinétique tissulaire complémentaires peuvent être entreprises:

— lorsqu'on constate une demi-vie sanguine allongée, suggérant la possibilité d'une accumulation de la substance d'essai dans différents tissus, ou

— pour voir si un niveau d'état stationnaire a été atteint dans des tissus particuliers (dans des études à doses répétées, par exemple, même quand un niveau d'état stationnaire a apparemment été atteint dans le sang, il peut être utile de s'assurer qu'il en est de même dans les tissus cibles).

55. Pour ce type d'étude en fonction du temps, il convient d'administrer une dose orale appropriée de la substance d'essai à au moins quatre animaux par dose et par point temporel, et de surveiller l'évolution dans le temps de la distribution dans les tissus choisis. À moins qu'une toxicité spécifique liée au sexe ait été observée, on emploiera des animaux d'un seul sexe. La question de savoir si l'analyse doit porter sur la radioactivité totale ou sur la substance mère et/ou ses métabolites dépendra du problème traité. La distribution tissulaire est évaluée à l'aide des techniques appropriées.

Induction/inhibition enzymatique

56. Des études sur les effets possibles de l'induction/inhibition enzymatique ou sur la biotransformation de la substance d'essai concernée peuvent être nécessaires dans l'un ou plusieurs des cas suivants:

1) lorsque des éléments indiquent une relation entre la biotransformation de la substance d'essai et l'augmentation de la toxicité;

2) lorsque les données de toxicité disponibles indiquent une relation non linéaire entre la dose et le métabolisme;

▼M4

3) si les études sur l'identification des métabolites révèlent un métabolite potentiellement toxique qui pourrait être le produit d'une voie enzymatique induite par la substance d'essai;

4) pour expliquer des effets a priori liés à des phénomènes d'induction enzymatique;

5) si l'on observe des modifications toxicologiques importantes dans le profil métabolique de la substance d'essai, dans le cadre d'expériences in vitro ou in vivo menées sur différentes espèces ou dans différentes conditions, il peut être nécessaire de caractériser l'enzyme ou les enzymes impliquées (par exemple, des enzymes de phase I comme les isoenzymes constituant le système des mono-oxygénases à cytochrome P 450, des enzymes de phase II comme les isoenzymes de la sulfotransférase ou de l'uridine diphosphate glucuronosyltransférase, ou tout autre enzyme pertinente). Ces informations peuvent servir à évaluer la pertinence des extrapolations interespèces.

57. Pour évaluer les variations toxicocinétiques liées à la substance d'essai, il convient de mettre en œuvre des protocoles d'étude adéquats, convenablement validés et justifiés. Ces études peuvent par exemple consister à administrer des doses répétées d'une substance d'essai non marquée, puis une dose unique radiomarquée le 14^{e} jour, ou des doses répétées d'une substance d'essai radiomarquée et des échantillonnages les 1er, 7^{e} et 14^{e} jours pour déterminer le profil des métabolites. L'administration de doses répétées d'une substance d'essai radiomarquée peut également fournir des renseignements sur la bioaccumulation (voir paragraphe 26).

MÉTHODES COMPLÉMENTAIRES

58. Outre les expériences in vivo décrites dans la présente méthode d'essai, des méthodes complémentaires peuvent fournir des informations sur l'absorption, la distribution, le métabolisme ou l'élimination d'une substance d'essai chez certaines espèces.

Utilisation d'informations in vitro

59. Plusieurs aspects concernant le métabolisme de la substance d'essai peuvent être étudiés dans le cadre d'études in vitro faisant appel à des systèmes d'essai appropriés. Des hépatocytes fraîchement isolés ou en culture et des fractions subcellulaires (par exemple microsomes et cytosol ou fraction S9) du foie peuvent servir à étudier les métabolites possibles. Le métabolisme local dans l'organe cible, par exemple le poumon, peut être intéressant pour l'évaluation des risques. À cette fin, les fractions microsomales des tissus cibles peuvent être utiles. Les études sur microsomes peuvent permettre de traiter les différences potentielles entre les sexes et selon les stades de la vie, et de caractériser les paramètres enzymatiques (K_m et V_{max}) qui peuvent aider à évaluer la dose-dépendance du métabolisme en lien avec les niveaux d'exposition. En outre, les microsomes peuvent permettre d'identifier les enzymes microsomales impliquées dans le métabolisme de la substance d'essai qui peuvent servir pour l'extrapolation inter-espèces (voir aussi paragraphe 56). On peut également examiner le potentiel d'induction de la biotransformation à l'aide de fractions subcellulaires du foie (par exemple, microsomes et cytosol) d'animaux prétraités par la substance d'essai concernée, par le biais d'études in vitro d'induction sur les hépatocytes, ou à partir de lignées cellulaires spécifiques exprimant des enzymes pertinentes. Dans certaines circonstances et certaines conditions, on peut envisager d'utiliser des fractions subcellulaires provenant de tissus humains, afin de déterminer les éventuelles différences entre espèces en matière de biotransformation. Les résultats d'études in vitro peuvent également servir à l'élaboration de modèles toxicocinétiques à base physiologique (TCBP) (5).

▼M4

60. Les études d'absorption cutanée in vitro peuvent fournir des renseignements supplémentaires pour caractériser l'absorption (6).

61. Des cultures primaires de cellules hépatiques et des coupes de tissus frais peuvent être utilisées pour répondre aux mêmes questions que les microsomes hépatiques. Dans certains cas, il est possible de répondre à certaines questions en utilisant des lignées cellulaires exprimant spécifiquement l'enzyme pertinente ou des lignées cellulaires génétiquement modifiées. Il peut aussi être utile d'étudier l'inhibition et l'induction d'isoenzymes particulières du cytochrome P450 (par exemple CYP1A1, 2E1, 1A2, etc.) et/ou d'enzymes de phase II par le composé parent dans le cadre d'essais in vitro. Les informations obtenues peuvent présenter de l'intérêt pour des composés de structure proche.

Utilisation des données toxicocinétiques provenant d'études de toxicité

62. L'analyse des échantillons de sang, de tissus et/ou d'excréta obtenus au cours d'autres études de toxicité peut fournir des données sur la biodisponibilité, l'évolution de la concentration plasmatique dans le temps (AUC, C_{max}), le potentiel de bioaccumulation, les taux d'élimination et les variations métaboliques et cinétiques liées au sexe ou au stade de vie.

63. Le plan d'étude peut aussi être adapté pour répondre à des questions concernant la saturation de l'absorption, les voies de biotransformation ou d'excrétion à des doses plus élevées, l'emprunt de nouvelles voies métaboliques à des doses plus élevées, ou la limitation des métabolites toxiques à des doses plus élevées.

64. D'autres aspects liés à l'évaluation des dangers peuvent aussi être abordés, notamment:

— la sensibilité en fonction de l'âge, qui dépend de l'état de la barrière hémato-encéphalique, des reins et/ou des capacités de détoxication,

— la sensibilité de certaines sous-populations due à des différences de capacité de biotransformation ou à d'autres différences toxicocinétiques,

— l'ampleur de l'exposition du fœtus par transfert transplacentaire des produits chimiques ou de celle du nouveau-né par le biais de la lactation.

Utilisation de modèles toxicocinétiques

65. Les modèles toxicocinétiques peuvent contribuer à différents aspects de l'évaluation des dangers et des risques, par exemple à la prévision de l'exposition systémique et de la dose délivrée aux tissus internes. En outre, pour aborder des questions particulières portant sur le mode d'action, ces modèles peuvent servir de base à l'extrapolation entre espèces, entre voies d'exposition, entre dosages, et à des fins d'évaluation des risques pour l'homme. Les données utiles à l'élaboration de modèles TCBP pour une substance d'essai sur une espèce quelconque sont 1) les coefficients de partage, 2) les constantes biochimiques et paramètres physiologiques, 3) les paramètres d'absorption des différentes voies d'exposition et 4) les données cinétiques in vivo pour l'évaluation des modèles [par exemple paramètres d'élimination pour les voies d'excrétion pertinentes (> 10 %), K_m et V_{max} pour le métabolisme]. Les données expérimentales utilisées pour élaborer le modèle sont obtenues par des méthodes scientifiquement valables, et les résultats du modèle sont validés. Les paramètres spécifiques à la substance d'essai ou à l'espèce, comme le taux d'absorption, le coefficient de partage sang-tissu et les constantes de vitesse métabolique, sont souvent déterminés pour faciliter l'élaboration de modèles non compartimentaux ou à base physiologique (7).

▼M4

RÉSULTATS ET RAPPORT

66. Il est recommandé de faire figurer une table des matières dans le rapport d'essai.

Corps du rapport

67. Le corps du rapport présente les informations décrites par la présente méthode d'essai, organisées en sections et paragraphes de la manière suivante:

Résumé

68. Cette section du rapport d'étude résume la conception de l'étude et décrit les méthodes utilisées. Elle met également en relief les principaux résultats concernant le bilan massique, la nature et l'importance des métabolites, les résidus tissulaires, le taux d'élimination, le potentiel de bioaccumulation, les différences liées au sexe, etc. Ce résumé est suffisamment détaillé pour permettre une évaluation des résultats.

Introduction

69. Cette section du rapport présente les objectifs de l'étude, les raisons l'ayant motivée et les principes de sa conception, ainsi que les références utiles et un historique permettant de la resituer.

Matériels et méthodes

70. Cette section du rapport décrit en détail toutes les informations pertinentes, notamment:

a) Substance d'essai

Cette sous-section porte sur l'identification de la substance d'essai: nom chimique, structure moléculaire, détermination qualitative et quantitative de sa composition chimique, pureté chimique et, si possible, type et quantité des éventuelles impuretés. Elle comprend également des informations sur les propriétés physico-chimiques de la substance, notamment: état physique, couleur, coefficient de solubilité et/ou de partage brut, stabilité et, éventuellement, corrosivité. Le cas échéant, des informations sont également données sur les isomères. Si la substance d'essai est radiomarquée, cette sous-section renseigne sur le type de radionucléide, la position du marqueur, l'activité spécifique et la pureté radiochimique.

Il convient d'indiquer le type de véhicule, diluant, agent de suspension, émulsifiant ou autre matériau utilisé pour administrer la substance d'essai, ou d'en donner une description.

b) Animaux d'expérience

Cette sous-section renseigne sur les animaux d'expérience, notamment: choix de l'espèce et de la souche et justification de ce choix, âge au début de l'étude, sexe, poids corporel, état de santé et conditions d'élevage.

c) Méthodes

Cette sous-section décrit en détail la conception de l'étude et la méthode utilisée. Elle comprend les éléments suivants:

1) justification des éventuelles modifications apportées à la voie ou aux conditions d'exposition, s'il y a lieu;

▼M4

2) justification du choix des niveaux de dose;

3) description des éventuelles études pilotes utilisées pour la conception expérimentale des études de suivi. Les données à l'appui des études pilotes sont jointes;

4) mode de préparation de la solution administrée et, le cas échéant, type de solvant ou de véhicule;

5) nombre de groupes de traitement et nombre d'animaux par groupe;

6) niveaux et volume des doses (et, si la radioactivité est utilisée, activité spécifique de la dose);

7) voie(s) et méthodes d'administration;

8) fréquence d'administration;

9) période de jeûne (le cas échéant);

10) radioactivité totale par animal;

11) manipulation des animaux;

12) collecte et traitement des échantillons;

13) méthodes d'analyse utilisées pour la séparation, la quantification et l'identification des métabolites;

14) limites de détection des méthodes employées;

15) autres mesures et protocoles expérimentaux utilisés (notamment validation des méthodes d'analyse des métabolites).

d) Analyse statistique

Si on recourt à l'analyse statistique pour dépouiller les résultats de l'étude, il convient d'apporter suffisamment d'informations sur la méthode d'analyse et le logiciel employés pour qu'un examinateur/statisticien indépendant puisse réévaluer et reconstruire l'analyse.

Si on recourt à une modélisation systémique (par exemple à un modèle TCBP), la présentation du modèle employé comporte une description complète du modèle, afin qu'un expert indépendant puisse reconstruire et valider celui-ci (voir le paragraphe 65 et l'appendice des définitions).

Résultats

71. Toutes les données sont récapitulées et présentées sous forme de tableaux accompagnés d'une évaluation statistique appropriée, comme décrit dans la présente section. Les données résultant du comptage de la radioactivité sont récapitulées et présentées de manière appropriée à l'étude, généralement en microgrammes ou milligrammes d'équivalents par masse d'échantillon, mais d'autres unités peuvent être utilisées. Cette section comporte des graphiques illustrant les résultats, reproduit les données chromatographiques et spectrométriques représentatives, identifie/quantifie les métabolites et présente les voies métaboliques proposées, y compris la structure moléculaire des métabolites. En outre, les renseignements suivants figurent, le cas échéant, dans cette section:

1) quantité et pourcentage de récupération de la radioactivité dans l'urine, les fèces, l'air expiré, ainsi que dans l'urine et les fèces récupérées lors du nettoyage de la cage.

— Pour les études par voie cutanée, inclure également les données relatives à la récupération de la substance d'essai sur la peau traitée et lors du nettoyage cutané, les données sur la radioactivité résiduelle présente dans le dispositif couvrant la peau et l'unité d'étude du métabolisme, ainsi que les résultats de l'étude de nettoyage cutané; pour plus de précisions, voir les paragraphes 74 à 77.

▼M4

— Pour les études par inhalation, inclure également des données sur la récupération de la substance d'essai dans les poumons et dans les tissus nasaux (8); pour plus de précisions, voir le paragraphe 78;

2) distribution tissulaire, en pourcentage de la dose administrée et en concentration (microgrammes d'équivalents par gramme de tissu) et ratios tissu/sang et tissu/plasma;

3) bilan-matière élaboré pour chaque étude impliquant l'analyse des tissus et des excréta;

4) concentrations plasmatiques et paramètres toxicocinétiques (biodisponibilité, AUC, C_{max}, T_{max}, élimination, demi-vie) après administration de la substance par la ou les voies d'exposition pertinentes;

5) vitesse et importance de l'absorption de la substance d'essai après administration par la ou les voies d'exposition pertinentes;

6) quantités de substance d'essai et de métabolites (en pourcentage de la dose administrée) collectées dans les excréta;

7) référence aux données présentées en annexe, qui comprennent les données par animal pour tous les critères de mesure (par exemple administration de la dose, pourcentage de récupération, concentrations, paramètres toxicocinétiques, etc.);

8) graphique représentant les voies métaboliques proposées et la structure moléculaire des métabolites.

Discussion et conclusions

72. Dans cette section, il convient pour le ou les auteurs de:

1) proposer une voie métabolique, en s'appuyant sur les résultats concernant le métabolisme et l'élimination de la substance d'essai;

2) examiner les éventuelles différences potentielles liées à l'espèce ou au sexe concernant l'élimination et/ou la biotransformation de la substance d'essai;

3) présenter dans un tableau et examiner l'identité et l'importance des métabolites, les taux d'élimination, le potentiel de bioaccumulation et le niveau des résidus tissulaires de la substance mère et/ou de ses métabolites, ainsi que les éventuelles modifications dose-dépendantes des paramètres toxicocinétiques, s'il y a lieu;

4) intégrer à cette section toute donnée toxicocinétique pertinente obtenue au cours d'études de toxicité;

5) formuler une conclusion succincte pouvant être étayée par les résultats de l'étude;

6) ajouter des sections supplémentaires (si nécessaire ou opportun).

73. Les sections supplémentaires serviront à présenter des informations bibliographiques, tableaux, graphiques, annexes, etc.

▼M4

AUTRES VOIES D'EXPOSITION

Voie cutanée

Traitement cutané

74. Cette section fournit des renseignements spécifiques sur les études de toxicocinétique par voie cutanée. Pour l'absorption cutanée, il convient de consulter le chapitre B.44 [Absorption cutanée: méthode in vivo (9)] de la présente annexe. Pour d'autres effets observés, tels que la distribution et le métabolisme, la présente méthode d'essai B.36 peut être utilisée. Pour le traitement par voie cutanée, on peut utiliser un ou plusieurs niveaux de dose. La substance d'essai (c'est-à-dire la préparation pure, diluée ou le mélange contenant la substance d'essai à appliquer sur la peau) est identique (ou représente un substitut réaliste) aux produits auxquels pourraient être exposés l'homme ou les autres espèces cibles potentielles. Le choix du ou des niveaux de dose s'effectue conformément aux indications des paragraphes 20 à 26 de la présente méthode d'essai. Parmi les facteurs à prendre en considération figurent l'exposition humaine potentielle et/ou les doses auxquelles une toxicité a été observée au cours d'autres études de toxicité cutanée. Si nécessaire, il convient de dissoudre la ou les doses cutanées dans un véhicule adéquat et de les appliquer dans un volume adapté à leur administration. Peu de temps avant l'essai, la fourrure de la région dorsale du tronc des animaux à tester est tondue. Le rasage peut être employé mais il est effectué environ 24 heures avant l'essai. Lorsque la fourrure est rasée ou tondue, cette opération s'effectue en évitant toute lésion de la peau qui pourrait entraîner une modification de sa perméabilité. Environ 10 % de la superficie corporelle sont dégagés pour application de la substance d'essai. Dans le cas de substances d'essai hautement toxiques, la zone couverte peut être plus petite, mais il convient de recouvrir une surface aussi large que possible d'une pellicule mince et uniforme. La surface de traitement utilisée est la même pour tous les groupes d'essai par voie cutanée. Les zones traitées sont recouvertes à l'aide d'une protection adaptée maintenue en place. Les animaux sont encagés séparément.

75. Une étude de nettoyage cutané est menée afin d'évaluer la quantité de la dose appliquée susceptible d'être retirée de la peau lors d'un lavage de la zone traitée au savon doux et à l'eau. Cette étude peut également aider à établir le bilan massique quand la substance d'essai est administrée par voie cutanée. Pour ce type d'étude, il convient d'appliquer une dose unique de la substance d'essai à deux animaux. Le niveau de dose est choisi conformément aux indications du paragraphe 23 de la présente méthode d'essai (voir également le paragraphe 76 à propos du temps de contact avec la peau). La quantité de substance d'essai récupérée lors de ce lavage permet d'évaluer l'efficacité d'élimination de la substance d'essai par la procédure de nettoyage.

76. Sauf si sa corrosivité l'empêche, la substance d'essai est appliquée et maintenue sur la peau pendant un minimum de 6 heures. Une fois la protection retirée, la zone traitée est lavée selon la procédure décrite pour l'étude de nettoyage cutané (voir paragraphe 75). La protection et la solution ayant servi au nettoyage sont analysées à la recherche de résidus de la substance d'essai. À la fin de l'étude, les animaux sont euthanasiés conformément à (2), et la peau traitée est prélevée. Une section appropriée de la peau traitée est analysée pour déterminer la présence résiduelle de la substance d'essai (radioactivité).

77. Pour l'évaluation toxicocinétique des produits pharmaceutiques, des procédures différentes peuvent être nécessaires, en accord avec les dispositions réglementaires.

▼M4

Inhalation

78. Pour ce type d'étude, on utilise une concentration unique de la substance d'essai, ou davantage si nécessaire. Le choix de la ou des concentrations s'effectue conformément aux indications des paragraphes 20 à 26 de la présente méthode d'essai. Les traitements par inhalation seront menés à l'aide d'un appareillage de type «cône nasal» ou «tête seule» pour empêcher l'absorption par d'autres voies d'exposition (8). Si d'autres méthodes d'exposition par inhalation sont retenues, il convient de justifier et de documenter ce choix. La durée d'exposition par inhalation est définie; elle est généralement comprise entre 4 et 6 heures.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) OCDE (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OCDE, Paris.

(2) OCDE (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Évaluation; Environmental Health and Safety Publications, Série sur les essais et évaluations n° 19, ENV/JM/MONO(2000), OCDE, Paris.

(3) Solon E.G., Kraus L. (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73-81.

(4) Stumpf W.E. (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25-40.

(5) Loizou G., Spendiff M., Barton H.A., Bessems J., Bois F.Y., d'Yvoire M.B., Buist H., Clewell H.J. 3rd, Meek B., Gundert-Remy U., Goerlitz G., Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400 – 411.

(6) Chapitre B.45 de la présente annexe, Absorption cutanée: méthode in vitro.

(7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-Based Pharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Genèv, Organisation mondiale de la santé, Programme international sur la sécurité des substances chimiques.

(8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Série sur les essais et évaluations n° 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(9) Chapitre B.44 de la présente annexe, Absorption cutanée: méthode in vivo.

(10) Barton H.A. *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(11) Gibaldi M. and Perrier D., (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Appendice

DÉFINITIONS

Absorption orale: pourcentage de la dose de substance d'essai absorbé à partir du site d'administration (à savoir le tractus gastro-intestinal). Ce paramètre essentiel peut permettre de comprendre quelle proportion de la substance d'essai administrée atteint la veine porte, et par la suite le foie.

Absorption: processus par le(s)quel(s) une substance chimique pénètre dans, ou traverse, des tissus. L'absorption se réfère au composé parent et à tous ses métabolites. À ne pas confondre avec la «biodisponibilité».

Accumulation (bioaccumulation): augmentation dans le temps de la quantité d'une substance d'essai présente dans les tissus (généralement les tissus adipeux, à la suite d'une exposition répétée); si une substance d'essai pénètre dans le corps à une vitesse supérieure à son taux d'élimination, cette substance s'accumule dans l'organisme et peut atteindre des concentrations toxiques.

ADME: acronyme de «Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion».

AUC (aire sous la courbe des concentrations plasmatiques): aire sous la courbe dans un diagramme représentant l'évolution dans le temps de la concentration d'une substance d'essai dans le plasma. Cette aire correspond à la quantité totale de substance d'essai absorbée par le corps pendant une période de temps prédéfinie. Dans des conditions de linéarité, l'AUC (du temps zéro à l'infini) est proportionnelle à la quantité totale de substance d'essai absorbée par le corps, indépendamment du taux d'absorption.

Autoradiographie microscopique des récepteurs (microautoradiographie des récepteurs): cette technique peut servir à étudier l'interaction xénobiotique avec des sites tissulaires ou des populations cellulaires spécifiques, par exemple dans le cadre d'études sur la fixation au récepteur ou le mode d'action spécifique qui peuvent nécessiter une qualité de résolution et de sensibilité impossible à obtenir par d'autres techniques comme l'autoradiographie du corps entier.

Autoradiographie (autoradiographie du corps entier): cette technique, qui sert à déterminer qualitativement et/ou quantitativement la localisation tissulaire d'une substance d'essai radioactive, utilise l'imagerie par rayons X ou, innovation plus récente, l'imagerie numérique par plaque au phosphore pour visualiser les molécules ou fragments de molécules radiomarqués en enregistrant le rayonnement émis au sein de l'objet étudié. Par rapport à la dissection des organes, l'autoradiographie quantitative du corps entier peut présenter des avantages pour évaluer la distribution de la substance d'essai, la récupération globale et la résolution du matériau radioactif dans les tissus. Par exemple, on peut utiliser cette technique sur un modèle animal pigmenté, afin d'évaluer l'association possible de la substance d'essai avec la mélanine, qui peut se lier à certaines molécules. Cependant, tout en offrant un moyen commode de visualiser l'ensemble des sites de fixation de grande capacité et de faible affinité dans le corps entier, cette technique est probablement moins performante pour identifier des sites cibles spécifiques tels que les sites de liaison au récepteur, dont la détection nécessite une résolution et une sensibilité relativement élevées. Lorsqu'on recourt à l'autoradiographie, les expériences visant à déterminer le bilan massique du composé administré sont menées sur un groupe séparé ou dans le cadre d'une étude distincte de l'étude de distribution tissulaire, dans laquelle tous les excréta (qui peuvent inclure également l'air expiré) et toutes les carcasses sont homogénéisés et analysés par comptage à scintillation liquide.

Bilan massique: comptabilité des entrées de la substance d'essai dans le système, et de ses sorties de celui- ci.

Bilan matière: voir «bilan massique».

Bioaccumulation: voir «Accumulation».

▼M4

Biodisponibilité: fraction d'une dose administrée qui atteint la circulation systémique ou est rendue disponible sur le site de l'activité physiologique. Généralement, la biodisponibilité d'une substance d'essai se réfère au composé parent, mais elle peut également se référer à ses métabolites. Elle ne tient compte que d'une seule forme chimique. *Nota bene* biodisponibilité et absorption ne sont pas synonymes. La différence, par exemple, entre l'absorption orale (c'est-à-dire la présence dans la paroi intestinale et la veine porte) et la biodisponibilité (c'est-à-dire la présence dans le sang systémique et dans les tissus) peut, entre autres facteurs, provenir de la dégradation chimique liée au métabolisme de la paroi intestinale, à l'efflux vers la lumière intestinale ou encore au métabolisme présystémique dans le foie (10). La biodisponibilité du composant toxique (composé parent ou métabolite) est un paramètre essentiel, dans l'évaluation des risques pour la santé humaine (extrapolation de dose élevée à faible, extrapolation de voie à voie), pour dériver une valeur interne de la dose sans effet nocif observé (DSENO) ou de la dose de référence (BMD) externes (dose appliquée). Pour étudier les effets sur le foie en cas d'administration orale, l'absorption orale suffit. Néanmoins, pour évaluer tout autre effet que l'effet à la porte d'entrée, la biodisponibilité est généralement un paramètre plus fiable pour l'évaluation des risques.

Biopersistance: voir «Persistance».

Biotransformation: conversion chimique (généralement enzymatique), dans l'organisme, d'une substance d'essai donnée en une autre. Synonyme de «métabolisme».

C_{max}: concentration maximale (pic de concentration) dans le sang (plasma/sérum) après l'administration, ou excrétion maximale (pic d'excrétion) urinaire ou fécale après l'administration.

Coefficient de partage: également appelé coefficient de distribution, il mesure la solubilité différentielle d'une substance chimique dans deux solvants.

Compartiment: portion (ou unité) structurelle ou biochimique d'un corps, d'un tissu ou d'une cellule séparée du reste de ce corps, de ce tissu ou de cette cellule.

Concentration sanguine (plasmatique) à l'état stationnaire: état hors équilibre d'un système ouvert dans lequel toutes les forces agissant sur le système sont exactement contrebalancées par des forces opposées, de sorte que tous les composants du système ont une concentration stationnaire, bien que de la matière s'écoule au travers de ce système.

Concentration sanguine (plasmatique/sérique) maximale: concentration maximale (pic de concentration) dans le sang (plasma/sérum) après l'administration (voir aussi «C_{max}»).

Demi-vie ($t_{1/2}$): temps nécessaire pour que la concentration de la substance d'essai diminue de moitié dans un compartiment. Elle se réfère généralement à la concentration plasmatique ou à la quantité de substance d'essai présente dans l'ensemble du corps.

Distribution: dispersion d'une substance d'essai et de ses dérivés au travers d'un organisme.

Distribution tissulaire: déplacement réversible d'une substance d'essai d'un endroit du corps à un autre. La distribution tissulaire peut s'étudier par dissection, homogénéisation, combustion et comptage par scintillation liquide des organes ou par autoradiographie qualitative et/ou quantitative du corps entier. La première méthode est utile pour obtenir la concentration et le pourcentage de récupération dans les tissus et la carcasse des mêmes animaux, mais peut avoir une résolution trop faible pour tous les tissus et atteindre une récupération globale inférieure à l'optimum (< 90 %). Voir la définition de l'autoradiographie.

Enzymes/Isoenzymes: protéines qui catalysent des réactions chimiques. Les isoenzymes sont des enzymes qui catalysent des réactions chimiques similaires mais diffèrent par leur séquence d'acides aminés.

Excrétion biliaire: excrétion par les voies biliaires.

▼M4

Excrétion: processus par le(s)quel(s) une substance d'essai administrée et/ou ses métabolites sont éliminés du corps.

Exogène: d'origine extérieure à l'organisme ou au système, ou produit à l'extérieur de lui.

Extrapolation: inférence d'une ou de plusieurs valeurs inconnues à partir de ce qui est connu ou a été observé.

Induction/induction enzymatique: synthèse d'enzymes en réponse à un stimulus environnemental ou à une molécule inductrice.

Linéarité/cinétique linéaire: en cinétique, un processus est linéaire quand tous les taux de transfert entre compartiments sont proportionnels aux quantités ou aux concentrations présentes, c'est-à-dire de premier ordre. En conséquence, les volumes d'élimination et de distribution sont constants, de même que les demi-vies. Les concentrations obtenues sont proportionnelles au taux d'administration (exposition), et l'accumulation est plus aisément prévisible. On peut juger de la linéarité/non-linéarité en comparant les paramètres pertinents, par exemple l'AUC, après administration de différentes doses ou après exposition unique et exposition répétée. L'absence de dose-dépendance peut indiquer la saturation des enzymes participant au métabolisme du composé; une augmentation de l'AUC après exposition répétée par rapport à une exposition unique peut indiquer une inhibition du métabolisme, et une diminution de l'AUC peut signaler une induction du métabolisme [voir aussi (11)].

Mécanisme (mode) de toxicité/d'action: le mécanisme d'action se réfère aux interactions biochimiques spécifiques par lesquelles une substance d'essai produit son effet. Le mode d'action se rapporte aux phénomènes plus généraux conduisant à la toxicité d'une substance d'essai.

Métabolisme: synonyme de «biotransformation».

Métabolites: produits du métabolisme ou des processus métaboliques.

Modélisation systémique (modèle toxicocinétique à base physiologique, à base pharmacocinétique, pharmacocinétique à base physiologique, à base biologique, etc.): modèle abstrait utilisant le langage mathématique pour décrire le comportement d'un système.

Paramètres enzymatiques: K_m, constante de Michaelis et V_{max}, vitesse maximale.

Persistance (biopersistance): présence à long terme d'une substance chimique (dans un système biologique) s'expliquant par sa résistance à la dégradation/l'élimination.

Prévision à partir de données croisées: les informations sur les effets mesurés pour une ou plusieurs substances chimiques sont utilisées pour prédire l'effet observé pour la substance chimique cible.

Saturation: état dans lequel un ou plusieurs processus cinétiques (par exemple, absorption, métabolisme ou élimination) sont à leur maximum (c'est-à-dire «saturés»).

Sensibilité: capacité d'une méthode ou d'un instrument de mesure à distinguer entre des réponses correspondant à différents niveaux d'une variable d'intérêt.

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Tissu cible: tissu sur lequel se manifeste un effet indésirable majeur d'une susbtance toxique.

T_{max}: temps nécessaire pour atteindre C_{max}.

▼**M4**

Toxicocinétique (pharmacocinétique): étude de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion des substances chimiques au cours du temps.

Validation des modèles: processus destiné à évaluer si un modèle décrit convenablement les données toxicocinétiques disponibles. Les modèles peuvent être évalués par comparaison statistique ou visuelle de leurs prévisions avec les valeurs expérimentales, en fonction d'une variable indépendante commune (par exemple le temps). L'ampleur de l'évaluation est justifiée en fonction de l'usage escompté du modèle.

Vitesse d'élimination: mesure quantitative de la vitesse à laquelle une substance d'essai est éliminée du sang, du plasma ou d'un tissu donné, par unité de temps.

Voie d'administration (orale, intraveineuse, cutanée, par inhalation, etc.): se rapporte aux moyens par lesquels une substance chimique est administrée dans le corps (par exemple, par gavage oral, oralement mélangée à la nourriture, par voie cutanée, par inhalation, en intraveineuse, etc.).

Voies de détoxication: série d'étapes conduisant à l'élimination des substances chimiques toxiques du corps, que ce soit par transformation métabolique ou par excrétion.

▼B

B.37. NEUROTOXICITÉ RETARDÉE DES SUBSTANCES ORGANOPHOSPORÉES APRÈS EXPOSITION AIGUË

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

Lorsqu'on évalue les effets toxiques des substances, il est important d'étudier la capacité qu'ont certaines substances à entraîner certains types de neurotoxicité que les autres études de toxicité pourraient ne pas mettre en évidence. Certains composés organophosphorés ont une neurotoxicité différée et doivent faire l'objet de telles études.

Des essais de dépistage in vitro peuvent être utilisés pour identifier les substances susceptibles d'entraîner une polyneuropathie différée; toutefois, des résultats négatifs à l'issue d'essais in vitro ne suffisent pas à prouver que la substance testée n'est pas neurotoxique.

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Les substances organophosphorées comprennent les esters, thioesters organophosphorés non chargés ou anhydrides des acides organophosphoriques, organophosphoniques ou organophos-phoramidiques ou des acides phosphorothioïques, phosphonothioïques ou phosphorothioamidiques apparentés ou d'autres substances pouvant entraîner la neurotoxicité différée parfois observée pour les substances de cette classe.

La neurotoxicité retardée est un syndrome associé à l'installation prolongée et d'ataxie retardée, associée à des axonopathies distales au niveau de la moelle épinière et des nerfs périphériques, et à une inhibition et un vieillissement de l'estérase caractéristique des neuropathies (neuropathy taret esterase — NTE) dans les tissus nerveux.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Une substance de référence peut être testée sur un lot témoin positif, afin de démontrer que, dans les conditions de l'essai, la réaction de l'espèce testée n'est pas modifiée de façon significative.

Le tri-o-tolyi phosphate est un exemple de produit neurotoxique couramment utilisé [n° CAS 78-30-8, n° EINECS 201-103-5, nomenclature CAS: acide phosphorique, tris(2-méthylphényl)ester]; il est également connu sous le nom de tns-o-crésylphosphate.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance à tester est administrée oralement, en une prise unique, à des poules domestiques qui ont été protégées, le cas échéant, contre des effets cholinergiques aigus. Les animaux sont observés pendant 21 jours pour détecter des troubles du comportement, une ataxie et une paralysie. Des analyses biochimiques sont réalisées, en particulier pour mettre en évidence l'inhibition de l'estérase NTE, sur des poules sélectionnées au hasard dans chaque lot, en général 24 et 48 heures après administration. 21 jours après l'exposition, les poules restantes sont sacrifiées et un examen histopathologique est effectué sur des tissus nerveux choisis.

▼B

1.5. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.5.1. **Préparation**

De jeunes poules adultes exemptes d'affections virales, ne faisant l'objet d'aucune médication susceptible d'interférer et ne présentant pas de troubles de la démarche sont réparties au hasard en lots d'expérience et lots témoins, et sont acclimatées aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours avant le début de l'étude.

Les cages ou enclos utilisés doivent être suffisamment grands pour que les poules puissent se mouvoir librement et pour que leur démarche puisse être aisément observée.

La substance à tester est généralement administrée oralement, par gavage ou dans des capsules de gélatine, ou par une méthode comparable. Les substances liquides peuvent être administrées directement ou dissoutes dans un véhicule approprié tel que l'huile de maïs; les substances solides doivent si possible être dissoutes car il se peut que d'importantes quantités de solides administrées dans des capsules de gélatine ne soient pas bien absorbées. Si le véhicule est autre que de l'eau, ses caractéristiques toxiques doivent être connues et, dans le cas contraire, déterminées avant le début de l'essai.

1.5.2. **Conditions de l'essai**

1.5.2.1. *Animaux d'expérience*

L'espèce recommandée est la poule pondeuse domestique adulte jeune âgée de 8-12 mois *(Gallus gallus domesticus)*. Il convient d'utiliser des races et souches de taille standard; les poules doivent normalement avoir été élevées dans des conditions leur permettant de se mouvoir librement.

1.5.2.2. *Nombre et sexe*

Outre le lot d'expérience, il faut prévoir un lot témoin recevant le véhicule seul et un lot témoin positif. Le lot recevant le véhicule seul doit être traité de la même façon que le lot d'expérience, exception faite de l'administration de la substance à tester.

Il faut prévoir suffisamment d'animaux dans chaque lot pour que l'on puisse en sacrifier au moins six pour effectuer les déterminations biochimiques (trois à chacun des deux temps de prélèvement) et qu'il en survive six après la période d'observation de 21 jours.

Le lot témoin positif peut être réalisé en parallèle ou provenir d'expériences antérieures récentes. Il doit se composer d'au moins six poules traitées par un produit neurotoxique connu à effet retardé; trois poules seront réservées aux examens biochimiques et trois à la recherche de signes pathologiques. La mise à jour périodique des données historiques recueillies antérieurement est recommandée. De nouveaux lots positifs devront être réalisés si une des conditions essentielles de l'expérience (par exemple souches, alimentation, hébergement) a été modifiée par le laboratoire chargé de l'essai.

▼B

1.5.2.3. *Niveau de doses*

Il convient d'effectuer une étude préliminaire sur un nombre approprié de poules réparties dans des lots traités à différentes doses, afin de déterminer la dose à utiliser pour l'étude principale. Un certain taux de mortalité est inévitable dans cette étude préliminaire. Toutefois, pour éviter la mort consécutive à des effets cholinergiques aigus, il est possible d'utiliser de l'atropine ou un autre agent protecteur ne perturbant pas la réaction neurotoxique différée. Diverses méthodes d'essai peuvent être utilisées pour évaluer la dose non létale maximale d'une substance (voir méthode B.1 *bis)*. Les données recueillies antérieurement sur les poules ou d'autres informations toxicologiques peuvent également être utiles pour déterminer la dose.

La dose utilisée dans l'étude principale doit être aussi élevée que possible, compte tenu des résultats de l'étude préliminaire et de la limite supérieure de 2 000 mg/kg poids corporel. Quel que soit le taux de mortalité, il doit subsister un nombre suffisant d'animaux pour effectuer les analyses biochimiques (six) et l'examen histologique (six) au 21^{e} jour. Il convient d'utiliser de l'atropine ou un autre agent qui ne perturbe pas les réactions neurotoxiques différées, afin d'éviter la mort par effets cholinergiques aigus.

1.5.2.4. *Essai limite*

Lorsqu'un essai réalisé selon le mode opératoire décrit ci-après, à une dose d'au moins 2 000 mg/kg p.c/jour, n'entraîne pas d'effets toxiques observables et que les données relatives aux substances de structure voisine ne laissent pas supposer une toxicité, il n'est pas nécessaire d'effectuer une étude à une dose plus élevée. L'essai limite est applicable, sauf lorsqu'une exposition humaine fait apparaître la nécessité d'utiliser une dose plus élevée.

1.5.2.5. *Période d'observation*

La période d'observation doit s'étendre sur 21 jours.

1.5.3. **Mode opératoire**

Après administration d'un agent protecteur pour éviter que des effets cholinergiques aigus n'entraînent la mort, la substance à tester est administrée en une prise unique.

1.5.3.1. *Observation générale*

L'observation doit débuter immédiatement après l'exposition. Toutes les poules sont observées soigneusement plusieurs fois au cours des deux premiers jours, puis au moins une fois par jour, pendant 21 jours ou jusqu'à la date prévue du sacrifice. Tous les signes de toxicité doivent être notés, ainsi que la date d'apparition des troubles du comportement, leur type, leur gravité et leur durée. L'ataxie doit être mesurée à l'aide d'une échelle d'évaluation ordinale comportant au moins quatre niveaux; la paralysie doit être notée. Au moins deux fois par semaine, les poules destinées à la recherche des signes pathologiques doivent être sorties de leurs cages et soumises à une épreuve d'activité motrice forcée, d'escalade d'échelles par exemple, afin de faciliter l'observation de faibles manifestations de toxicité. Les animaux moribonds ou présentant des signes de détresse ou de souffrance intense doivent être immédiatement retirés de l'étude, euthanasiés et autopsiés.

▼B

1.5.3.2. *Poids corporel*

Toutes les poules sont pesées juste avant l'administration de la substance, et au moins une fois par semaine par la suite.

1.5.3.3. *Biochimie*

Six poules choisies au hasard dans chacun des lots d'expérience et des lots témoins négatifs, ainsi que trois poules prélevées dans le lot témoin positif (si l'essai est réalisé en parallèle sur ce dernier) sont sacrifiées quelques jours après administration; le cerveau et la moelle épinière lombaire sont préparés et analysés pour détecter l'inhibition de l'estérase caractéristique des neuropathies. Il peut en outre s'avérer utile d'analyser l'inhibition de cette estérase sur du nerf sciatique. En règle générale, trois poules du lot témoin et de chaque lot d'expérience sont sacrifiées après 24 heures et trois autres après 48 heures, tandis que les trois poules du lot témoin positif sont sacrifiées après 24 heures. Si l'observation des signes cliniques d'intoxication (souvent estimés par le moment d'apparition des effets cholinergiques) indique que la substance toxique est éliminée très lentement, il peut s'avérer préférable de prélever les tissus sur trois poules à deux autres temps compris entre 24 heures et au plus tard 72 heures après administration.

S'il y a lieu, il est également possible d'effectuer des déterminations de l'acétylcholinestérase (AChE) sur des échantillons. Toutefois, il peut y avoir réactivation spontanée de l'acétylcholinestérase in vivo, ce qui pourrait faire sous-estimer l'activité de la substance en tant qu'inhibiteur de l'AChE.

1.5.3.4. *Autopsie*

L'autopsie de tous les animaux (sacrifices prévus ou exigés par l'état de l'animal) doit comporter un examen de l'aspect du cerveau et de la moelle épinière.

1.5.3.5. *Examen histopathologique*

Les tissus nerveux des animaux survivants après la période d'observation et non utilisés pour les études biochimiques doivent faire l'objet d'un examen microscopique. Les tissus doivent être fixés in situ par des techniques de perfusion. Les coupes doivent être pratiquées au niveau du cervelet (plan longitudinal moyen), du bulbe rachidien, de la moelle épinière et des nerfs périphériques. Les coupes de la moelle épinière seront pratiquées dans la partie cervicale supérieure, dans la région thoracique moyenne et dans la région lombo-sacrée. Des coupes devront également être réalisées dans la partie distale du nerf tibial et au niveau de ses ramifications vers les muscles gastroenémiens, ainsi qu'au niveau du nerf sciatique. Les coupes seront colorées à l'aide de colorants appropriés, spécifiques de la myéline et des axones.

2. **RÉSULTATS**

En règle générale, si les résultats obtenus pour les différents points d'évaluation retenus (biochimie, histopathologie et observation du comportement) sont négatifs, il n'est normalement pas nécessaire de poursuivre les essais de neurotoxicité différée. Les résultats équivoques ou non concluants peuvent nécessiter une poursuite de l'étude.

Les résultats doivent être indiqués pour chaque animal, individuellement. En outre, tous les résultats doivent être présentés sous forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux présents au début de l'essai, le nombre d'animaux présentant des lésions, des troubles du comportement ou des modifications biochimiques, le type et la gravité de ces lésions ou troubles, ainsi que le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion ou trouble aux différents niveaux de gravité.

▼B

Les résultats de cette étude doivent être évalués du point de vue de l'incidence, de la gravité et de la corrélation entre les effets comportementaux, biochimiques et histopathologiques et tout autre effet observé dans les lots traités et les lots témoins.

Les résultats numériques seront évalués par des méthodes statistiques appropriées et reconnues. Ces méthodes statistiques doivent être choisies lors de la conception de l'étude.

3. **COMPTE RENDU**

PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience:

— souche utilisée,

— nombre d'animaux et âge,

— origine, conditions d'hébergement, etc.,

— poids de chaque animal au début de l'expérience.

Conditions expérimentales:

— détails concernant la préparation de la substance à tester, sa stabilité et son homogénéité, s'il y a lieu,

— justification du choix du véhicule,

— détails concernant l'administration de la substance à tester,

— détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau,

— justification du choix de la dose,

— spécification des doses administrées, avec indications détaillées concernant le véhicule, le volume et la forme physique de la substance administrée,

— identité de l'agent protecteur éventuel et détails concernant son administration.

Résultats:

— données relatives au poids corporel,

— données concernant la réaction toxique par groupe, y compris la mortalité,

— nature, gravité et durée des effets cliniques observés (réversibilité éventuelle),

— description détaillée des méthodes biochimiques et de leurs résultats,

— résultats de l'autopsie,

— description détaillée de tous les résultats histopathologiques,

— le cas échéant, traitement statistique des résultats.

Discussion des résultats

Conclusion

4. **RÉFÉRENCES**

Cette méthode reprend la ligne directrice 418 de l'OCDE.

▼B

B.38. NEUROTOXICITÉ RETARDÉE DES SUBSTANCES ORGANOPHOSPHORÉES ÉTUDE PAR ADMINISTRATION RÉITÉRÉE SUR 28 JOURS

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

Lorsqu'on évalue les effets toxiques des substances, il est important d'étudier la capacité qu'ont certaines substances à entraîner certains types de neurotoxicité que les autres études de toxicité pourraient ne pas mettre en évidence. Certains composés organophosphorés ont une neurotoxicité différée et doivent faire l'objet de telles études.

Des essais de dépistage in vitro peuvent être utilisés pour identifier les substances susceptibles d'entraîner une polyneuropathie différée; toutefois, des résultats négatifs à l'issue d'études in vitro ne suffisent pas à prouver que la substance testée n'est pas neurotoxique.

Cet essai de neurotoxicité retardée sur 28 jours fournit des informations sur d'éventuels dangers pour la santé pouvant découler d'expositions répétées au cours d'une période déterminée. Il donnera des informations sur la relation dose-effet et pourra fournir une estimation du niveau de dose sans effet néfaste observé, pouvant être utile à l'établissement des critères de sécurité pour l'exposition.

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Les substances organophosphorées comprennent les esters, thioesters organophosphorés non chargés ou anhydrides des acides organophosphoriques, organophosphoniques ou organophos-phoramidiques ou des acides phosphorothioïques, phosphonothioïques ou phosphorothioamidiques apparentés ou d'autres substances pouvant entraîner la neurotoxicité différée parfois observée pour les substances de cette classe.

La neurotoxicité retardée est un syndrome associé à l'installation prolongée et d'ataxie retardée, associée à des axonopathies distales au niveau de la moelle épinière et des nerfs périphériques, et à une inhibition et un vieillissement de l'estérase caractéristique des neuropathies (neuropathy target esterase — NTE) dans les tissus nerveux.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance à tester est administrée quotidiennement par voie orale à des poules domestiques pendant 28 jours. Les animaux sont observés au moins une fois par jour pour rechercher des troubles du comportement, une ataxie et une paralysie, et ce jusqu'au 14^{e} jour après administration de la dernière dose. Des analyses biochimiques sont réalisées, en particulier pour mettre en évidence l'inhibition de l'estérase NTE, sur des poules sélectionnées au hasard dans chaque lot, en général 24 et 48 heures après la dernière administration. Deux semaines après la dernière administration, les poules restantes sont sacrifiées et un examen histopathologique est effectué sur certains tissus nerveux.

▼B

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. **Préparation**

De jeunes poules adultes exemptes d'affections virales, ne faisant l'objet d'aucune médication susceptible d'interférer et ne présentant pas de troubles de la démarche sont réparties au hasard entre les lots d'expérience et les lots témoins, et sont acclimatées aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours avant le début de l'étude.

Les cages ou enclos utilisés doivent être suffisamment grands pour que les poules puissent se déplacer librement et pour que leur démarche puisse être aisément observée.

La substance à tester doit être administrée par voie orale chaque jour, sept jours sur sept, de préférence par gavage ou dans des capsules de gélatine. Les substances liquides peuvent être administrées directement ou dissoutes dans un véhicule approprié tel que l'huile de maïs; les substances solides doivent si possible être dissoutes car il se peut que d'importantes quantités de solides administrées dans des capsules de gélatine ne soient pas bien absorbées. Si le véhicule est autre que de l'eau, ses caractéristiques toxiques doivent être connues et, dans le cas contraire, déterminées avant le début de l'essai.

1.4.2. **Conditions de l'essai**

1.4.2.1. *Animaux d'expérience*

Il est recommandé d'utiliser de jeunes poules pondeuses adultes *(Gallus quitus domesticus)* âgées de 8 à 12 mois. Il convient d'utiliser des races et souches de taille standard; les poules doivent normalement avoir été élevées dans des conditions leur permettant de se déplacer librement.

1.4.2.2. *Nombre et sexe*

En règle générale, il faut prévoir au moins trois lots d'expérience et un lot témoin recevant uniquement le véhicule. Le lot recevant le véhicule seul doit être traité de la même façon que le lot d'expérience, exception faite de l'administration de la substance à tester.

Il faut prévoir suffisamment d'animaux dans chaque lot pour que l'on puisse en sacrifier au moins six pour effectuer les analyses biochimiques (trois lors de chacun des deux temps de prélèvement) et qu'il en survive six après la période d'observation post-traitement de 14 jours.

1.4.2.3. *Doses*

Les doses doivent être sélectionnées en tenant compte des résultats d'un essai de neurotoxicité retardée après exposition aigué et de toute autre information disponible concernant la toxicité ou la cinétique de la substance à tester. La dose la plus élevée doit être choisie dans le but de produire des effets toxiques et de préférence une neurotoxicité différée, sans entraîner la mort ni des souffrances manifestes. Il convient ensuite de définir une série décroissante de doses afin de mettre en évidence une éventuelle relation dose-effet et une dose minimale n'entraînant aucun effet observable.

▼B

1.4.2.4. *Essai limite*

Lorsqu'un essai réalisé selon le mode opératoire décrit ci-après, à une dose d'au moins 1 000 mg/kg p.c./jour, n'entraîne pas d'effets toxiques observables et que les données relatives aux substances de structure apparentée ne laissent pas supposer une toxicité, il n'est pas nécessaire d'effectuer une étude à une dose plus élevée. L'essai limite est applicable, sauf lorsqu'une exposition humaine fait apparaître la nécessité d'utiliser une dose plus élevée.

1.4.2.5. *Période d'observation*

Tous les animaux doivent être observés au moins une fois par jour pendant la période d'exposition et pendant les 14 jours suivants, sauf si une autopsie est prévue.

1.4.3. **Mode opératoire**

La substance à tester est administrée tous les jours, sept jours sur sept, pendant 28 jours.

1.4.3.1. *Observation générale*

L'observation doit débuter immédiatement après l'exposition. Toutes les poules sont observées attentivement au moins une fois par jour pendant les 28 jours de traitement et pendant les 14 jours suivants ou jusqu'à la date prévue de leur sacrifice. Tous les signes de toxicité doivent être consignés, ainsi que leur date d'apparition, leur type, leur gravité et leur durée. L'observation doit porter sur les troubles du comportement, sans toutefois s'y limiter. L'ataxie doit être mesurée à l'aide d'une échelle d'évaluation ordinale comportant au moins quatre niveaux; la paralysie doit être consignée. Au moins deux fois par semaine, les poules doivent être sorties de leurs cages et soumises à une épreuve d'activité motrice forcée, d'escalade d'échelles, par exemple, afin de faciliter l'observation des effets toxiques minimaux. Les animaux moribonds ou présentant des signes de détresse ou de souffrance intense doivent être immédiatement retirés de l'étude, euthanasiés et autopsiés.

1.4.3.2. *Poids corporel*

Toutes les poules sont pesées juste avant la première administration de la substance, et au moins une fois par semaine par la suite.

1.4.3.3. *Biochimie*

Six poules prélevées au hasard dans chacun des lots d'expérience et des lots témoins recevant le véhicule seul sont sacrifiées quelques jours après la dernière administration; le cerveau et la moelle épinière lombaire sont préparés et analysés pour détecter l'inhibition de l'estérase caractéristique des neuropathies (NTE). Il peut en outre s'avérer utile de rechercher l'inhibition de cette estérase sur le nerf sciatique. En règle générale, trois poules du lot témoin et de chaque lot d'expérience sont sacrifiées 24 heures après la dernière administration et trois autres 24 heures plus tard, soit 48 heures après la dernière administration; si les résultats de l'étude par exposition aigué ou d'autres études (étude toxicocinétique, par exemple) indiquent qu'il est préférable de choisir d'autres temps de sacrifice, les temps de sacrifices seront modifiés en conséquence et les documents justificatifs seront fournis.

S'il y a lieu, il est également possible d'effectuer des déterminations de l'acétylcholinestérase (AChE) sur ces échantillons. Toutefois, il peut y avoir réactivation spontanée de l'acétylcholinestérase in vivo, ce qui pourrait faire sous-estimer l'activité de la substance en tant qu'inhibiteur de l'AChE.

▼B

1.4.3.4. *Autopsie*

L autopsie de tous les animaux (sacrifice programmé ou imposé par l'état des animaux) doit comporter un examen de l'aspect du cerveau et de la moelle épinière.

1.4.3.5. *Examen histopathologique*

Les tissus nerveux des animaux survivants après la période d'observation et non utilisés pour les études biochimiques doivent faire l'objet d'un examen microscopique. Les tissus doivent être fixés in situ par des techniques de perfusion. Les coupes doivent être pratiquées au niveau du cervelet (plan longitudinal moyen), du bulbe rachidien, de la moelle épinière et des nerfs périphériques. Les coupes de la moelle épinière seront pratiquées dans la partie cervicale supérieure, dans la région thoracique moyenne et dans la région sacro-lombaire. Des coupes devront également être réalisées dans la région distale du nerf tibial et au niveau de ses ramifications vers les muscles jumeaux du triceps, ainsi qu'au niveau du nerf sciatique. Les coupes seront colorées à l'aide de colorants appropriés, spécifiques de la myéline et des axones. Dans un premier temps, l'examen microscopique sera effectué sur les tissus conservés de tous les animaux du lot traité à la dose la plus élevée et du lot témoin. Si des effets sont mis en évidence dans le lot traité à la dose la plus élevée, l'examen microscopique devra également porter sur les tissus des animaux des lots traités à la dose intermédiaire et à la dose faible.

2. **RÉSULTATS**

En règle générale, si les résultats obtenus pour les différents critères d'évaluation retenus dans cette méthode (biochimie, histopathologie et observation du comportement) sont négatifs, il n'est pas nécessaire de poursuivre les essais de neurotoxicité différée. Les résultats équivoques ou non concluants peuvent nécessiter une poursuite de l'étude.

Les résultats doivent être indiqués pour chaque animal, individuellement. En outre, tous les résultats doivent être récapitulés dans un tableau indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux présents au début de l'essai, le nombre d'animaux présentant des lésions, des troubles du comportement ou des modifications biochimiques, le type et la gravité de ces lésions ou symptômes, ainsi que le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion ou symptôme aux différents niveaux de gravité.

Les résultats de cette étude doivent être évalués du point de vue de l'incidence, de la gravité et de la corrélation entre les effets comportementaux, biochimiques et histopathologiques et tout autre effet observé dans les lots traités et les lots témoins.

Les résultats numériques seront évalués par des méthodes appropriées et reconnues. Ces méthodes statistiques doivent être choisies lors de la conception de l'étude.

3. **COMPTE RENDU**

PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience:

— souche utilisée,

— nombre d'animaux et âge,

— origine, conditions d'hébergement, etc.,

— poids de chaque animal au début de l'expérience.

▼B

Conditions expérimentales:

— détails concernant la préparation de la substance à tester, sa stabilité et son homogénéité, s'il y a lieu,

— justification du choix du véhicule,

— détails concernant l'administration de la substance à tester,

— détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau,

— justification du choix de la dose,

— spécification des doses administrées, avec indications détaillées concernant le véhicule, le volume et la forme physique de la substance administrée,

— si les déterminations biochimiques ne sont pas pratiquées 24 et 48 heures après la dernière administration, justification du choix d'autres temps.

Résultats:

— données relatives au poids corporel,

— données concernant la réaction toxique par groupe, y compris la mortalité,

— niveau de dose sans effet néfaste observé,

— nature, gravité et durée des effets cliniques observés (réversibilité éventuelle),

— description détaillée des méthodes biochimiques et de leurs résultats,

— résultats de l'autopsie,

— description détaillée de tous les résultats histopathologiques,

— le cas échéant, traitement statistique des résultats.

Discussion des résultats

Conclusion

4. **RÉFÉRENCES**

Cette méthode reprend la ligne directive 419 de l'OCDE.

▼B

B.39. ESSAI IN VIVO DE SYNTHÈSE NON PROGRAMMÉE DE L'ADN (UDS) SUR CELLULES HÉPATIQUES DE MAMMIFÈRE

1. MÉTHODE

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 486, Essai in vivo de synthèse non programmée de l'ADN (UDS) sur cellules hépatiques de mammifères (1997).

1.1. INTRODUCTION

L'essai in vivo de synthèse non programmée de l'ADN (unscheduled DNA synthesis, UDS) sur cellules hépatiques de mammifère est destiné à identifier les substances qui induisent la réparation de l'ADN dans les cellules hépatiques des animaux traités (1, 2, 3, 4).

Cet essai in vivo constitue une méthode d'étude des effets génotoxiques des substances chimiques dans le foie. L'effet mesuré témoigne de l'altération de l'ADN et de la réparation qui en résulte dans les cellules hépatiques. Comme le foie est généralement le principal site du métabolisme des substances absorbées, il constitue un site approprié pour la détermination in vivo des altérations de l'ADN.

Il ne faut pas avoir recours à cet essai s'il est manifeste que la substance d'essai ou un métabolite réactif n'atteindra pas le tissu cible.

La synthèse non programmée de l'ADN (UDS) est mesurée en déterminant l'incorporation de nucléosides marqués dans les cellules qui ne subissent pas une synthèse programmée (phase S) de l'ADN. La technique la plus couramment utilisée est la détermination par autoradiographie de l'incorporation de thymidine marquée au tritium (^{3}H-TdR). On utilise de préférence le foie de rat pour les essais UDS *in vivo*. D'autres tissus peuvent être utilisés mais ne font pas l'objet de cette méthode.

La détection d'une UDS dépend du nombre de bases d'ADN excisées et remplacées au site de l'altération. Ainsi, l'essai UDS est particulièrement utile pour détecter la réparation de longues séquences (20-30 bases) induite par la substance. Par contre, la réparation de courtes séquences (1-3 bases) est détectée avec une sensibilité beaucoup plus faible. En outre, des événements mutagènes peuvent résulter d'une non-réparation, d'une réparation erronée d'altérations de l'ADN ou d'une réplication erronée. L'ampleur de l'UDS ne fournit aucune indication quant à la fidélité du processus de réparation. D'autre part, il est possible qu'un mutagène réagisse avec l'ADN sans que l'altération de celui-ci soit réparée par un processus de réparation par excision. Le fait que l'essai UDS ne fournit pas d'informations spécifiques sur l'activité mutagène est compensé par la sensibilité potentielle de ce critère parce qu'il est mesuré dans la totalité du génome.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Cellules en réparation: nombre net de grains (NNG) supérieur à une valeur préétablie à justifier par le laboratoire effectuant l'essai.

Nombre net de grains (NNG): mesure quantitative de l'activité UDS de cellules lors d'essais UDS autoradiographiques; calculé en soustrayant du nombre de grains nucléaires (GN) le nombre moyen de grains cytoplasmiques dans des zones cytoplasmiques équivalentes au noyau (GC): NNG = GN -GG. Les NNG sont calculés pour les cellules individuelles, puis regroupés pour les cellules d'une culture, de cultures parallèles, etc.

▼B

Synthèse réparatrice de l'ADN (UDS): synthèse de réparation de l'ADN après excision et élimination d'un fragment d'ADN contenant une région lésée par des substances chimiques ou physiques.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

L'essai UDS in vivo sur cellules hépatiques de mammifère indique une synthèse de réparation de l'ADN après excision et élimination d'un fragment d'ADN contenant une région altérée par des substances chimiques ou physiques. L'essai repose généralement sur l'incorporation de ^{3}H-TdR dans l'ADN de cellules hépatiques qui présentent une faible fréquence de cellules dans la phase S du cycle cellulaire. L'incorporation de ^{3}H-TdR est généralement déterminée par autoradiographie dans la mesure où cette technique n'est pas sensible aux interférences dues aux cellules en phase S comme c'est le cas du comptage en scintillation liquide, par exemple.

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.4.1. **Préparations**

1.4.1.1. *Sélection de l'espèce animale*

Le rat est communément utilisé, bien que n'importe quelle espèce de mammifère appropriée puisse être employée. Il convient d'utiliser des animaux adultes, jeunes et sains issus de souches couramment utilisées en laboratoire. Au début de l'étude, la différence pondérale des animaux doit être minimale et ne pas dépasser ± 20 % du poids moyen de chaque sexe.

1.4.1.2. *Conditions d'encagement et régime alimentaire*

Les conditions générales décrites dans l'introduction générale de la partie B sont appliquées mais le taux d'humidité devrait se situer aux environs de 50-60 %.

1.4.1.3. *Préparation des animaux*

De jeunes adultes sains sont répartis par randomisation entre les groupes des animaux témoins et traités. Les cages doivent être disposées de telle manière qu'il n'y ait pas d'effet dû à leur emplacement. Ils sont identifiés individuellement. Ils sont gardés dans leur cage pendant au moins cinq jours avant le début de l'étude, de façon à les acclimater aux conditions du laboratoire.

1.4.1.4. *Substance d'essai/préparation*

Les substances d'essai solides sont préparées par dissolution ou suspension dans un véhicule ou un solvant approprié, puis éventuellement diluées avant l'administration aux animaux. Les substances d'essai liquides peuvent être administrées directement ou après dilution. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les domaines du stockage.

1.4.2. **Conditions expérimentales**

1.4.2.1. *Solvant/véhicule*

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas avoir d'effet toxique aux doses utilisées ni présenter de réaction chimique avec la substance d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données faisant état de leur compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un solvant/véhicule aqueux, chaque fois que cela est possible.

▼B

1.4.2.2. *Témoins*

Des témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule) doivent être inclus dans chaque partie indépendante de l'expérience. Les animaux des groupes témoins sont traités exactement comme ceux des groupes traités, mise à part l'administration de la substance d'essai.

Les témoins positifs doivent être *des* substances dont on sait qu'elles produisent une UDS à des niveaux d'exposition supposés conduire à un accroissement détectable par rapport au bruit de fond. Les témoins positifs pour lesquels une activation métabolique est nécessaire doivent être utilisés à des doses qui donnent lieu à une réponse modérée (4). Les doses peuvent être choisies de façon que les effets soient évidents et que l'identité des lames codées ne soit pas révélée immédiatement à l'examinateur. Les substances indiquées dans le tableau ci-dessous sont des exemples de témoins positifs.

Moment de prélèvement	Substance	№ CAS	N° Einecs
Précoce (2-4 heures)	N-nitrosodiméthylamine	62-75-9	200-249-8
Tardif (12-16 heures)	N-2-fluorénylacétamide (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

D'autres témoins positifs appropriés peuvent être utilisés. Le témoin positif doit être administré par une voie différente de celle utilisée pour la substance d'essai.

1.5. MODE OPÉRATOIRE

1.5.1. **Nombre et sexe des animaux**

Il convient d'utiliser un nombre adéquat d'animaux afin de tenir compte de variations interindividuelles de la réponse à l'essai. Il doit y avoir au moins 3 animaux analysables par groupe. Lorsqu'on dispose d'une importante quantité de données historiques, les groupes témoins négatifs et positifs peuvent ne comprendre que 1 ou 2 animaux.

Si, au moment de l'étude, on dispose de données historiques effectuées avec la même espèce et ayant utilisé la même voie d'administration, qui démontrent l'absence de différence importante de toxicité entre sexes, on peut effectuer l'essai avec des animaux d'un seul sexe, de préférence des mâles. Si l'exposition humaine est spécifique du sexe, par exemple dans le cas de certains produits pharmaceutiques, des animaux du sexe approprié doivent être utilisés pour l'essai.

1.5.2. **Modalité de traitement**

Les substances d'essai sont généralement administrées en une seule fois.

1.5.3. **Niveaux de dose**

Normalement, on utilise au moins deux niveaux de dose. La dose la plus élevée est définie comme la dose qui produit des signes de toxicité tels qu'ils font supposer que des doses plus fortes, administrées suivant les mêmes modalités, seraient létales. En général, la dose la plus faible est comprise entre la moitié et le quart de la dose la plus forte.

▼B

Les substances possédant une activité biologique spécifique à des doses faibles et non toxiques (comme les hormones et les mitogènes) peuvent faire exception à ces critères d'établissement de doses et doivent être évaluées cas par cas. Si une étude préliminaire est réalisée afin d'évaluer les niveaux de dose, cette étude doit être effectuée dans le même laboratoire en utilisant la même espèce, la même souche, des animaux du même sexe et la même modalité de traitement que ceux de l'étude principale.

La dose la plus élevée peut aussi être définie comme étant celle qui produit certains indices de toxicité dans le foie (noyaux pyenotiques, par exemple).

1.5.4. **Test limite**

Si un essai réalisé avec au moins 2 000 mg/kg de poids corporel, en une seule dose ou en deux doses administrées le même jour, n'engendre aucun effet toxique observable et si une génotoxicité est improbable d'après les données relatives à des substances de structure voisine, on peut considérer qu'une étude complète n'est pas nécessaire. Suivant l'importance de l'exposition humaine probable, on peut envisager d'utiliser des doses plus fortes dans l'essai de dose limite.

1.5.5. **Voies d'administration**

La substance d'essai est généralement administrée par gavage à l'aide d'une sonde gastrique *ou d'une* canule d'intubation adaptée. D'autres voies d'exposition sont acceptables lorsqu'elles peuvent être justifiées. La voie péritonéale n'est toutefois pas recommandée, étant donné qu'elle peut conduire à une exposition directe du foie à la substance d'essai plutôt que par l'intermédiaire du système circulatoire. Le volume maximal de liquide administre en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne devrait pas dépasser 2 ml/100 g de poids corporel. Une justification doit être fournie si des volumes plus importants sont administrés. Il convient de réduire au minimum la variation du volume administré en ajustant la concentration à tous les niveaux de doses, sauf pour les produits irritants ou corrosifs dont les effets sont généralement exacerbés lorsqu'on augmente la concentration.

1.5.6. **Préparation des cellules hépatiques**

Les cellules hépatiques des animaux traités sont normalement préparées 12-16 heures après le traitement. Un prélèvement supplémentaire effectué plus tôt (normalement 2-4 heures après le traitement) est en général nécessaire, à moins qu'il y ait une réponse manifestement positive après 12-16 heures. Toutefois, d'autres délais de prélèvement peuvent être utilisés s'ils sont justifiés sur la base de données toxicocinétiques.

Les cultures à court terme de cellules hépatiques de mammifère sont habituellement établies en perfusant le foie in situ avec la collagénase et en laissant les cellules fraîchement dissociées se fixer sur une surface appropriée. Les cellules hépatiques des témoins négatifs doivent présenter une viabilité (5) d'au moins 50 pour cent.

1.5.7. **Détermination de l'UDS**

Les cellules hépatiques de mammifère fraîchement isolées sont généralement incubées dans un milieu contenant du ^{3}H-TdR pendant une durée appropriée (3-8 heures, par exemple). A la fin de la période d'incubation, le milieu est enlevé des cellules, qui peuvent ensuite être incubées avec un milieu contenant un excès de thymidine non marquée, afin de réduire la radioactivité non incorporée (*cold chase*). Les cellules sont ensuite rincées, fixées et séchées. Pour les périodes d'incubation plus longues, la *cold chase* n'est pas absolument nécessaire. Les lames sont plongées dans une émulsion autoradiographique, maintenues dans l'obscurité (réfrigérées pendant 7-14 jours, par exemple), développées et colorées. On procède ensuite au comptage des grains d'argent. On prépare deux à trois lames pour chaque animal.

▼B

1.5.8. **Analyse**

Les préparations sur lame doivent contenir un nombre suffisant de cellules de morphologie normale pour qu'une évaluation probante de l'UDS soit possible. Les préparations sont examinées au microscope en vue de la recherche de signes de cytotoxirité manifeste (pyenose, diminution du niveau de marquage radioactif, par exemple).

Les lames doivent être codées avant le comptage des grains. On analyse normalement 100 cellules de chaque animal sur au moins deux lames; l'analyse d'un nombre inférieur à 100 cellules/animal doit être justifié. Le nombre de grains n'est pas déterminé pour les noyaux en phase S, mais la proportion de cellules en phase S peut être enregistrée.

Le niveau d'incorporation de ^{3}H-TdR dans le noyau et le cytoplasme des cellules morphologiquement normales, tel qu'il est mis en évidence par le dépôt de grains d'argent, doit être déterminé à l'aide de méthodes appropriées.

Le nombre de grains est déterminé au niveau du noyau (grains nucléaires, GN) et des zones du cytoplasme équivalentes au noyau (grains cytoplasmiques, GC). Le nombre de GC est déterminé sur la base soit de la région du cytoplasme la plus fortement marquée, soit de la moyenne de deux ou trois régions proches du noyau choisies au hasard. D'autres méthodes de comptage (cellules entières, par exemple) peuvent être utilisées si on peut les justifier (6).

2. **RÉSULTATS**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Les données doivent être indiquées individuellement pour chaque culture. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux. Le nombre net de grains (NNG) doit être déterminé pour chaque cellule, chaque animal, chaque dose et chaque temps de prélèvement en soustrayant le nombre de GC du nombre de GN. Si des «cellules en réparation» sont comptées, les critères pour définir les «cellules en réparation» doivent être justifiés et se fonder sur des données historiques ou sur des témoins négatifs concomitants. Les résultats numériques peuvent être évalués à l'aide de méthodes statistiques. Dans ce cas, il faut choisir et justifier les tests statistiques avant la réalisation de l'étude.

2.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Exemples de critères permettant de conclure à une réponse positive ou négative:

positive
- i) valeur NNG supérieure à un seuil préétabli justifié sur la base des données historiques du laboratoire, ou
- ii) valeur NNG significativement supérieure à celle du témoin concomitant,

négative
- i) valeur NNG inférieure ou égale au seuil des contrôles historiques, ou
- ii) valeur NNG non significativement supérieure à celle du témoin concomitant.

▼B

Il convient de prendre en considération la pertinence biologique des données (paramètres tels que la variation interindividuelle, la relation dose-réponse et la cytotoxicité). L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats nettement positifs ou négatifs, dans certains cas rares l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas une conclusion catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Un résultat positif à l'essai UDS in vivo sur cellules hépatiques de mammifère indique que la substance d'essai induit des altérations de l'ADN dans les cellules hépatiques de mammifère in vivo qui peuvent être réparées par la synthèse non programmée de l'ADN in vitro. Un résultat négatif signifie que, dans les conditions de l'essai, la substance d'essai n'induit pas d'altération de l'ADN détectable par cet essai.

Le fait que la substance d'essai atteint la circulation générale ou spécifiquement le tissu cible (toxicité systémique) devrait être discutée.

3. **RAPPORT**

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Solvant/véhicule:

— justification du choix du véhicule,

— solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Animaux d'expérience:

— espèce/souche utilisée,

— nombre, âge et sexe des animaux,

— source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,

— poids individuels des animaux au début de l'essai, y compris l'intervalle des poids, la moyenne et l'écart-type dans chaque groupe.

Conditions expérimentales:

— données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule),

— résultats de l'étude de détermination des doses utiles, si elle a été réalisée,

— justification du choix des doses employées,

— détails concernant la préparation de la substance d'essai,

— détails concernant l'administration de la substance d'essai,

— justification du choix de la voie d'administration,

— méthodes pour vérifier que la substance a atteint ta circulation générale ou le tissu cible, le cas échéant,

▼B

— conversion de la concentration (ppm) de la substance d'essai dans l'eau de boisson ou la nourriture en dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu,

— détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau,

— description détaillée des modalités de traitement et de prélèvement,

— méthodes de mesure de la toxicité,

— méthode de préparation et de culture des cellules hépatiques,

— technique autoradiographique utilisée,

— nombre de lames préparées et nombre de cellules analysées,

— critères d'évaluation,

— critères de décision concernant les résultats positifs, négatifs et équivoques.

Résultats:

— valeurs moyennes du nombre de grains nucléaires, du nombre de grains cytoplasmiques et du nombre net de grains pour chaque lame, animal et groupe,

— relation dose-réponse, si possible,

— évaluation statistique, le cas échéant,

— signes de toxicité,

— données sur les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs concomitants,

— données sur les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs antérieurs (étendues, moyennes et écarts-types),

— nombre de «cellules en réparation», s'il a été déterminé,

— nombre de cellules en phase S, s'il a été déterminé,

— viabilité des cellules.

Discussion des résultats.

Conclusions.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the In Vivo Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.,* 156, pp. 1 — 18.

(2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the In Vivo Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, *Mutation Res.,* 189, pp. 123 — 133.

(3) Kennelly, J. C, Waters, R., Ashby. J., Lefevre, P. A., Burlinson B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell I. de G. (1993), In Vivo Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M, (eds.), *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mulagenicity Testing Report. Part II revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52 — 77.

▼B

(4) Madle. S., Dean. S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C, Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests In Vitro and In Vivo, *Mutations Res.,* 312, pp. 263 — 285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initital Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the In Vivo/In Vitro DNA Repair Assay (UDS), *Mutation Res. 291*. pp. 21 — 27.

(6) Mirsalis, J. C, Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the In Vivo/In Vitro Hepafocyte HNA Repair Assay, *Environ Mutagen,* 4, pp. 553 — 562.

▼M8

B.40. CORROSION CUTANEE *IN VITRO*: ESSAI DE RESISTANCE ELECTRIQUE TRANSCUTANEE (RET)

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 430 (2015) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La corrosion cutanée désigne la survenue de lésions irréversibles de la peau, qui se manifestent par une nécrose visible, à travers l'épiderme et jusque dans le derme, suite à l'application d'un produit chimique d'essai [selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU) (1) et du règlement (CE) n° 1272/2008 de l'Union européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (ci-après le «règlement CLP» ([1])]. La présente version mise à jour de la méthode d'essai B.40 propose une procédure *in vitro* permettant d'identifier les substances et mélanges corrosifs et non corrosifs selon la définition du SGH de l'ONU (1) et du règlement CLP.

2. Traditionnellement, l'évaluation de la corrosivité cutanée a impliqué le recours à des animaux de laboratoire (méthode d'essai B.4, équivalente à la ligne directrice 404 de l'OCDE, initialement adoptée en 1981 et révisée en 1992, 2002 et 2015) (2). Outre la présente méthode d'essai B.40, d'autres méthodes d'essai *in vitro* pour tester le potentiel de corrosion de la peau des produits chimiques ont été validées et adoptées, à savoir la méthode d'essai B.40 *bis*, équivalente à la ligne directrice 431 de l'OCDE (3) et la méthode d'essai B.65 (équivalente à la ligne directrice 435 de l'OCDE) (4), et sont capables d'identifier les sous-catégories de produits chimiques corrosifs quand cela est requis. Plusieurs méthodes d'essai *in vitro* validées ont été adoptées, notamment la ligne directrice B.46 (équivalente à la ligne directrice 439 de l'OCDE) (5), aux fins de tester l'irritation de la peau. Un document guide de l'OCDE sur les approches intégrées en matière d'essai et d'évaluation IATA en anglais pour l'irritation et la corrosion de la peau propose une approche modulaire pour les tests d'irritation et de corrosion de la peau. L'approche intégrée décrit plusieurs modules qui regroupent les sources d'information et les outils d'analyse, et fournit des guides sur la façon i)d'intégrer et d'utiliser les informations existantes sur les données d'essai et autres données pour l'évaluation du potentiel irritant et corrosif pour la peau des produits chimiques d'essai, et ii) propose une approche dans les cas où des tests supplémentaires sont recommandés (6).

3. La présente méthode d'essai porte sur le danger de corrosion cutanée pour la santé humaine. Elle s'appuie sur la méthode d'essai de résistance électrique transcutanée (RET) pratiquée sur un épiderme de rat, laquelle utilise des disques cutanés pour identifier les produits chimiques corrosifs sur la base de leur capacité à provoquer la perte de l'intégrité du *stratum corneum* normal et de la fonction de barrière. La présente méthode d'essai a été initialement adoptée en 2004 et mise à jour en 2015 pour faire référence au document guide IATA.

4. En vue d'évaluer les essais de corrosion cutanée *in vitro* à des fins réglementaires, des études de pré-validation (7) ont été réalisées, suivies d'une étude formelle de validation de la méthode d'essai de RET sur peau de rat axée sur la corrosion cutanée (8) (9) (10) (11). Sur la base des résultats de

([1]) Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2008, JO L 353 du 31.12.2008, p. 1.

▼**M8**

ces études, il est désormais recommandé que la méthode d'essai de RET (désignée comme la méthode de référence validée – MRV –) puisse servir, à des fins réglementaires, à évaluer la corrosivité cutanée *in vivo* (12) (13) (14).

5. Avant de pouvoir utiliser à des fins réglementaires une méthode d'essai *in vitro* de RET (corrosivité cutanée) similaire ou modifiée autre que la MRV, il convient d'en déterminer la fiabilité, la pertinence (précision) et les limitations pour l'usage préconisé, afin de s'assurer de sa similitude avec la MRV, conformément aux normes de performance (15). L'acceptation mutuelle des données ne sera garantie qu'après examen et intégration de toute méthode d'essai nouvelle ou actualisée proposée dans la ligne directrice d'essai correspondante de l'OCDE.

DÉFINITIONS

6. Les définitions utilisées figurent à l'appendice 1.

CONSIDÉRATIONS INITIALES

7. Selon une étude de validation (10) et d'autres études publiées (16) (17), la méthode d'essai de RET sur peau de rat permet de faire la distinction entre produits corrosifs et produits non corrosifs pour la peau avec une sensibilité globale de 94 % (51/54) et une spécificité de 71 % (48/68) pour une base de données de 122 substances.

8. La présente méthode d'essai se rapporte au volet «corrosion cutanée *in vitro*». Elle permet d'identifier les produits chimiques d'essai corrosifs et non corrosifs selon la définition du SGH de l'ONU/du règlement CLP. Une limite de cette méthode d'essai, comme l'ont montré les études de validation (8) (9) (10) (11), est qu'elle ne permet pas de classer en sous-catégories les substances et mélanges corrosifs conformément au SGH de l'ONU/règlement CLP. Son utilisation sera fonction de la réglementation en vigueur. Si la présente méthode d'essai ne fournit pas d'informations appropriées sur l'irritation cutanée, on notera en revanche que la méthode d'essai B.46 porte spécifiquement sur les essais d'irritation cutanée *in vitro* (5). Pour une évaluation complète des effets cutanés locaux après une exposition unique, le document guide IATA (6) devra être consulté.

9. Les essais réalisés dans le cadre de l'étude de validation sous-tendant cette méthode d'essai ont porté sur un large éventail de produits chimiques représentant principalement des substances; la base de données empiriques de cette étude totalisait 60 substances couvrant une grande variété de classes chimiques (8) (9). D'après l'ensemble des données disponibles, cette méthode d'essai peut être utilisée pour tester un large éventail de classes chimiques et d'états physiques, notamment des liquides, des semi-solides, des solides et des cires. Cependant, étant donné que pour certains états physiques, les éléments d'essai pour lesquels il existe des données de référence appropriées ne sont pas facilement disponibles, on notera qu'un nombre relativement restreint de cires et de matières solides corrosives ont été évaluées durant la validation. Les liquides peuvent être aqueux ou non; les solides peuvent être solubles ou insolubles dans l'eau. Dans les cas où l'on peut apporter la preuve que les méthodes d'essai figurant dans cette méthode d'essai ne peuvent s'appliquer à une catégorie donnée de substances, il convient de ne pas utiliser cette méthode d'essai pour tester la catégorie de substances en question. De plus, outre les substances, cette méthode d'essai est présumée pouvoir s'appliquer aux mélanges. Or, les mélanges couvrant un large éventail de catégories et de compositions, et compte tenu des informations limitées disponibles actuellement à propos des essais de mélanges, dans les cas où l'on peut apporter la preuve que cette méthode d'essai ne peut s'appliquer à une catégorie donnée de mélanges (par exemple selon la stratégie proposée par Eskes *et al.*, 2012) (18), la méthode d'essai ne doit pas être utilisée pour tester la catégorie de

▼M8

mélanges en question. Avant d'utiliser la présente méthode d'essai pour tester un mélange afin de générer des données dans un but réglementaire, il convient de s'assurer et de justifier le cas échéant, que les données générées seront adéquates. De telles dispositions ne sont pas nécessaires quand il existe une exigence réglementaire de tester le mélange. Les gaz et les aérosols n'ont pas encore fait l'objet d'études de validation (8) (9). Bien qu'il soit envisageable de pouvoir tester des gaz et des aérosols en faisant appel à la méthode d'essai de RET, l'actuelle méthode d'essai ne permet pas de tester les produits de ce type.

PRINCIPE DE L'ESSAI

10. Le produit chimique d'essai est appliqué pour une durée n'excédant pas 24 heures sur la surface épidermique de disques de peau, placés dans un système d'essai à deux compartiments pour lequel les disques de peau font office de séparation entre les compartiments. Ces disques cutanés sont prélevés sur la peau de jeunes rats âgés de 28 à 30 jours et euthanasiés. Les produits chimiques corrosifs sont identifiés sur la base de leur capacité à provoquer la perte de l'intégrité du *stratum corneum* normal et de la fonction de barrière, cette perte étant mesurée comme une diminution de la RET en deçà d'une valeur seuil (16) (paragraphe 32). Dans le cas de l'épiderme de rat, une valeur de seuil de la RET de 5 kΩ a été retenue, sur la base de nombreuses données relatives à un large éventail de substances, desquelles il ressortait que l'immense majorité des valeurs étaient soit très supérieures (souvent > 10 kΩ), soit très inférieures (souvent < 3 kΩ) à cette valeur de seuil (16). De manière générale, les produits chimiques non corrosifs sur les animaux, mais irritants ou non irritants, ne font pas baisser la RET en dessous de ce seuil. Par ailleurs, l'utilisation d'autres préparations de peau ou d'autres équipements est susceptible de modifier la valeur de seuil, ce qui impose de procéder à une validation supplémentaire.

11. Une étape de fixation d'un colorant est incorporée dans la procédure d'essai pour confirmer les résultats positifs de la RET présentant des valeurs autour de 5 kΩ. Cette étape de fixation d'un colorant détermine en effet si l'accroissement de la perméabilité ionique est imputable à la destruction physique du *stratum corneum*. Dans la pratique, la méthode de l'essai de RET sur peau de rat prédit très bien la corrosivité *in vivo* sur le lapin évalué dans la méthode d'essai B.4 de l'OCDE (2).

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

12. Avant d'appliquer en routine la méthode de RET sur peau de rat à la présente méthode d'essai, les laboratoires font la preuve de leur compétence technique en classifiant correctement les douze sunstances recommandés dans le tableau 1. Dans le cas où une substance ne serait pas disponible ou dans les cas où cela se justifie, une autre substance pour laquelle il existe des données de référence *in vivo* et *in vitro* peut être utilisée (par exemple en choisissant dans la liste des produits chimiques de référence (16)), pourvu que les mêmes critères de sélection tels que décrits dans le tableau 1 soient appliqués.

Tableau 1

Liste des substances d'épreuve de compétence ([1])

Substance	Numéro CAS	Classe chimique ([2])	Cat. SGH de l'ONU/du CLP d'après les résultats *in vivo* ([3])	Cat. MRV d'après les résultats in vitro	État physique	pH ([4])
Substances corrosives in vivo						
N,N'-diméthyl dipropylènetriamine	10563-29-8	base organique	1A	6 × C	L	8,3
Diamino-1,2 propane	78-90-0	base organique	1A	6 × C	L	8,3

▼**M8**

Substance	Numéro CAS	Classe chimique (2)	Cat. SGH de l'ONU/du CLP d'après les résultats *in vivo* (3)	Cat. MRV d'après les résultats in vitro	État physique	pH (4)
Substances corrosives in vivo						
Acide sulfurique (10 %)	7664-93-9	acide inorganique	(1A/)1B/1C	5 × C 1 × NC	L	1,2
Hydroxyde de potassium (solution aqueuse à 10 %)	1310-58-3	acide inorganique	(1A/)1B/1C	6 × C	L	13,2
Acide octanoïque (caprylique)	124-07-2	acide organique	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,6
2-tert-butylphénol	88-18-6	phénol	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,9
Substances non corrosives in vivo						
Acide isostéarique	2724-58-5	acide organique	NC	6 × NC	L	3,6
4-amino-1,2,4-triazole	584-13-4	base organique	NC	6 × NC	S	5,5
Bromure de phénétyle	103-63-9	électrophile	NC	6 × NC	L	3,6
4-(méthylthio)-benzaldéhyde	3446-89-7	électrophile	NC	6 × NC	L	6,8
1,9-décadiène	1647-16-1	organique neutre	NC	6 × NC	L	3,9
tétrachloréthylène	127-18-4	organique neutre	NC	6 × NC	L	4,5

Abréviations: aq = aqueux; CAS = numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service; MRV = méthode de référence validée; C = corrosive; NC = non corrosive.

(1) Ces substances d'épreuve de compétence, d'abord classées en substances corrosives et non corrosives, puis par sous-catégorie de substances corrosives, puis par classe chimique, ont été choisies parmi les substances utilisées dans l'étude de validation du CEVMA de la méthode d'essai de RET sur peau de rat (8) (9). Sauf cas contraire, les substances ont été testées au niveau de pureté obtenu pour les substances en provenance du commerce (9). Cette sélection inclut, dans la mesure du possible, des substances qui: (i) sont représentatives de la gamme des réactions de corrosion provoquées (par exemple non corrosives; faiblement à fortement corrosives) que la MRV est capable de mesurer ou de prévoir; (ii) sont représentatives des classes chimiques utilisées dans l'étude de validation; (iii) reflètent les caractéristiques de performance de la MRV; (iv) ont une structure chimique bien définie; (v) permettent d'obtenir des résultats définitifs avec la méthode d'essai in vivo de référence; (vi) sont disponibles dans le commerce et (vii) ne sont pas associées à des coûts d'élimination prohibitifs).

(2) Classe chimique assignée par Barratt et al. (8).

(3) Les groupes d'emballage de l'ONU correspondants sont les groupes I, II et III respectivement pour les catégories 1A, 1B et 1C du SGH de l'ONU/du règlement CLP.

(4) Les valeurs de pH ont été tirées de Fentem *et al.* (9) et Barratt *et al.* (8).

▼M8

PROCÉDURE

13. Il existe des modes opératoires normalisés pour la méthode d'essai de RET sur peau de rat (corrosion cutanée) (19). Les méthodes d'essai de RET sur épiderme de rat couvertes par cette méthode d'essai doivent se conformer aux critères suivants:

Animaux

14. Il convient d'utiliser des rats parce que la sensibilité de leur épiderme aux substances de cette méthode d'essai a été prouvée (12) et qu'il s'agit de la seule source de peau ayant été validée formellement (8) (9). L'âge (au moment du prélèvement de la peau) et la souche utilisée sont des critères déterminants, puisqu'il est essentiel que les follicules pileux soient en phase dormante avant le début de la pousse de la fourrure adulte.

15. Les poils du dos et des flancs des jeunes rats (Wistar ou souche comparable) mâles ou femelles, âgés approximativement de 22 jours, sont soigneusement coupés à l'aide d'une petite tondeuse. Les animaux sont ensuite nettoyés soigneusement avec un linge humide, la zone tondue étant plongée dans une solution antibiotique (contenant, par exemple, de la streptomycine, de la pénicilline, du chloramphénicol et de l'amphotéricine à des concentrations efficaces pour inhiber la croissance bactérienne). Les animaux sont lavés une nouvelle fois avec des antibiotiques le troisième ou le quatrième jour après le premier lavage, et doivent ensuite être utilisés dans un délai de 3 jours, lorsque le *stratum corneum* a récupéré de la tonte.

Préparation des disques cutanés

16. Les animaux, âgés de 28 à 30 jours (cet âge est particulièrement important) sont euthanasiés. On prélève la peau dorso-latérale de chaque animal et on la débarrasse soigneusement du tissu adipeux en excès. Des disques cutanés, d'un diamètre approximatif de 20 mm chacun sont prélevés. La peau peut être stockée avant d'utiliser les disques lorsqu'il est établi que les données de contrôle positif et négatif sont équivalentes à celles obtenues avec de la peau fraîche.

17. Chaque disque cutané est placé sur l'extrémité d'un tube PTFE (polytétrafluoroéthylène) en veillant à ce que la surface épidermique soit en contact avec le tube. Après avoir ajusté de force un joint torique en caoutchouc sur l'extrémité du tube pour maintenir la peau en place, on coupe le tissu excédentaire. Le joint torique en caoutchouc est ensuite soigneusement fixé de manière étanche à l'extrémité du tube PTFE à l'aide de vaseline. Le tube est introduit dans une chambre réceptrice contenant une solution de sulfate de magnésium (154 mM) dans lequel il est maintenu par une pince à ressort (figure 1). Le disque cutané doit être complètement immergé dans la solution de sulfate de magnésium ($MgSO_4$). Entre 10 et 15 disques cutanés peuvent être prélevés de la peau d'un rat. Les dimensions du tube et du joint torique sont indiquées à la figure 2.

18. Avant le début de l'essai proprement dit, on mesure, pour chaque peau de rat, la RET de deux disques cutanés, à titre de contrôle de la qualité. Pour que les autres disques d'une même peau soient valables pour la méthode d'essai, il faut que les deux disques donnent des valeurs de résistance électrique supérieures à 10 kΩ. Si la résistance est inférieure à 10 kΩ, les disques restants provenant de la même peau doivent être éliminés.

Application du produit chimique d'essai et substances de contrôle

19. Pour chaque essai, des substances de contrôle positif et négatif doivent être utilisées parallèlement au produit chimique d'essai, de façon à garantir la qualité des résultats du modèle expérimental. Chaque essai doit être réalisé en utilisant les disques de peau provenant d'un seul et même animal. Les substances de contrôle positif et négatif recommandées sont respectivement l'acide chlorhydrique 10 M et l'eau distillée.

▼M8

20. Les produits chimiques liquides testés (150 µl) sont appliqués sur la surface épidermique à l'intérieur du tube. Pour l'essai de produits chimiques solides, une quantité suffisante du solide est appliquée uniformément sur le disque de peau, de façon à ce que la totalité de la surface de l'épiderme soit couverte. Après avoir ajouté de l'eau désionisée (150 µl) sur les solides, on agite le tube doucement. Afin d'optimiser le contact avec la peau, certains solides doivent être chauffés à 30 °C pour dissoudre le produit chimique d'essai ou être broyés pour obtenir des grains ou une poudre.

21. On utilise trois disques cutanés pour chaque produit chimique d'essai à chaque expérience. Ces produits chimiques d'essai sont appliqués pendant 24 heures à une température de 20 à 23 °C, puis éliminés par lavage sous l'eau du robinet à température ambiante.

Mesures de la RET

22. L'impédance de la peau, c'est-à-dire la RET, est mesurée à l'aide d'un pont de mesure de Wheatstone en courant alternatif basse tension (18), présentant les caractéristiques suivantes: tension de 1 à 3 Volts, courant alternatif de forme sinusoïdale ou rectangulaire compris entre 50 et 1 000 Hz, et une plage de mesure minimale entre 0,1 et 30 kΩ. Le pont de mesure utilisé dans l'étude de validation permettait de mesurer l'inductance, la capacitance et la résistance jusqu'à des valeurs respectivement de 2 000 H, 2 000 µF et 2 MΩ, à des fréquences de 100 Hz ou 1 kHz, en utilisant des valeurs en parallèle ou en série. Pour les besoins de l'essai RET de corrosivité, les mesures sont enregistrées en résistance, à une fréquence de 100 Hz et à l'aide de valeurs en série. Avant la mesure de la résistance électrique, on réduit la tension de surface de la peau en ajoutant un volume suffisant d'éthanol à 70 % pour couvrir l'épiderme. Après quelques secondes, on enlève l'éthanol du tube, puis on hydrate le tissu par l'addition de 3 ml d'une solution de sulfate de magnésium (154 mM). Les électrodes du pont de mesure sont placées de part et d'autre du disque cutané pour prendre la mesure de la résistance en kΩ/disque cutané (figure 1). Les dimensions des électrodes et la longueur d'électrode exposée sous les pinces crocodiles sont indiquées à la figure 2. La pince maintenant l'électrode intérieure repose sur la partie supérieure du tube PTFE pendant la mesure de la résistance, afin que la longueur d'électrode immergée dans la solution de sulfate de magnésium reste constante. L'électrode extérieure est introduite dans le compartiment receveur de manière à reposer sur le fond de celui-ci. La distance entre la pince à ressort et la partie inférieure du tube PTFE est maintenue constante (figure 2), cette distance influençant la valeur de résistance obtenue. Par conséquent, la distance entre l'électrode intérieure et le disque cutané doit être constante et minimale (1 à 2 mm).

23. Il convient de noter que si la valeur de résistance mesurée est supérieure à 20 kΩ, ceci peut être dû au fait que des restes du produit chimique d'essai couvrent la surface épidermique du disque de peau. On peut essayer de retirer davantage de produit chimique d'essai, par exemple en fermant de façon étanche le tube PTFE avec le pouce revêtu d'un gant et en l'agitant pendant 10 secondes environ. On élimine ensuite la solution de sulfate de magnésium et on répète la mesure de la résistance avec une nouvelle solution de sulfate de magnésium.

24. Les caractéristiques et dimensions de l'appareil d'essai et de la procédure expérimentale peuvent avoir une incidence sur les valeurs de RET obtenues. Le seuil de corrosivité de 5 kΩ a été défini sur la base des données obtenues à partir de l'appareil et de la procédure spécifiques décrits dans cette méthode d'essai. Avec un autre équipement ou dans des conditions d'essai différentes, les valeurs de seuil et de contrôle peuvent être différentes. Par conséquent, il est nécessaire d'étalonner la méthodologie et la valeur de seuil de résistance en testant différentes substances d'épreuve de compétence, choisis parmi ceux utilisés dans l'étude de validation (8)(9), ou dans des classes chimiques équivalentes à celles des substances étudiées. Un ensemble de substances d'épreuve de compétence est présenté au tableau 1.

▼M8

Méthodes avec fixation d'un colorant

25. L'exposition à certains produits chimiques non corrosifs peut entraîner une réduction de la résistance sous la valeur de seuil de 5 kΩ, permettant ainsi le passage d'ions à travers le *stratum corneum*, ce qui réduit ainsi la résistance électrique (9). Par exemple, les substances organiques neutres et les substances tensio-actives (détergents, émulsifiants et autres agents de surface) peuvent évacuer les lipides de la peau et accroître la perméabilité aux ions de la barrière cutanée. En conséquence, si les valeurs de RET obtenues avec ces produits chimiques sont inférieures à, ou proches de, 5 kΩ, en l'absence de toute lésion visible sur les disques cutanés, une étude de pénétration d'un colorant doit être menée sur les tissus traités et de contrôle, afin de déterminer si ces valeurs de RET résultent d'une perméabilité accrue ou d'une corrosion de la peau (7) (9). S'il s'agit d'une corrosion, autrement dit si le *stratum corneum* est rompu, le colorant sulforhodamine B appliqué à la surface de la peau pénètre rapidement et teinte les tissus sous-jacents. Ce colorant reste stable au contact d'un large éventail de substances et n'est pas affecté par la procédure d'extraction décrite ci-après.

Application et élimination du colorant Sulforhodamine B

26. Après l'essai de RET, le sulfate de magnésium est évacué du tube et la peau est soigneusement examinée. Si aucune lésion majeure n'est visible (par exemple une perforation), 150 µl d'une dilution à 10 % (p/v) de sulforhodamine B (Acid Red 52; C.I. 45100; numéro CAS 3520-42-1) dans de l'eau distillée sont appliqués sur la surface épidermique de chaque disque pendant 2 heures. Les disques cutanés sont lavés ensuite sous un jet d'eau courante à température ambiante pendant environ 10 secondes pour éliminer le colorant excédentaireou non fixé. Chaque disque cutané est soigneusement enlevé du tube PTFE et placé dans un flacon (par exemple un flacon à scintillation en verre de 20 ml) contenant de l'eau désionisée (8 ml). Les flacons sont agités doucement pendant 5 minutes pour éliminer complètement tout colorant excédentaire ou non fixé. Après avoir répété l'opération de rinçage, on enlève les disques cutanés et on les place dans des flacons contenant 5 ml de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 30 % (p/v) dans de l'eau distillée, puis on les incube pendant une nuit à 60 °C.

27. Après incubation, chaque disque de peau est retiré et jeté, et la solution restante est centrifugée pendant 8 minutes à 210 °C (force centrifuge relative ~175 × g). Un échantillon de 1 ml de surnageant est ensuite dilué dans un rapport de 1 à 5 (v/v) [soit 1 ml + 4 ml] avec du SDS à 30 % (p/v) dans de l'eau distillée. La densité optique (DO) de la solution est mesurée à environ 565 nm.

Calcul de la teneur en colorant

28. La teneur de chaque disque en colorant sulforhodamine B est calculée sur la base des valeurs de DO (9) (coefficient d'extinction molaire de la sulforhodamine B à 12 nm = 8,7 × $l0^4$; poids moléculaire = 580). La teneur en sulforhodamine B est déterminée pour chaque disque de peau à l'aide d'une courbe-étalon appropriée et on calcule ensuite une teneur moyenne en colorant pour les essais répétés.

Critères d'acceptabilité

29. Les valeurs moyennes de la RET sont acceptées à condition que les valeurs des contrôles positifs et négatifs effectués parallèlement se situent dans les plages acceptables pour la méthode en laboratoire d'essai. Les plages acceptables de valeur de résistance pour la méthodologie et l'appareillage décrits ci-avant sont les suivantes:

▼**M8**

Contrôle	Substance	Plage de résistance (kΩ)
Positif	Acide chlorhydrique 10 M	0,5 - 1,0
Négatif	Eau distillée	10 - 25

30. Les valeurs moyennes de la fixation du colorant sont acceptées à condition que les valeurs des contrôles effectués parallèlement se situent dans la plage acceptable pour la méthode. Les plages acceptables de teneur en colorant pour les substances de contrôle proposées pour la méthodologie et l'appareillage décrits ci-avant sont indiquées dans le tableau suivant:

Contrôle	Substance	Plage de teneur en colorant (µg/disque)
Positif	Acide chlorhydrique 10 M	40 - 100
Négatif	Eau distillée	15 - 35

Interprétation des résultats

31. La valeur seuil de RET qui permet de distinguer les produits chimiques corrosifs des produits non corrosifs a été déterminée lors de l'optimisation de la méthode d'essai, testée durant une phase de pré-validation, puis confirmée dans le cadre d'une étude formelle de validation.

32. Le modèle prédictif de la méthode d'essai de RET sur épiderme de rat (9) (19), associé au système de classification du SGH de l'ONU/du règlement CLP, est le suivant:

On considère que le produit chimique d'essai est non corrosif pour la peau:

i) si la valeur moyenne de la RET pour le produit chimique d'essai est supérieure à 5 kΩ, ou

ii) si la valeur moyenne de la RET pour le produit chimique d'essai est inférieure ou égale (≤) à 5 kΩ, et

— que les disques de peau ne montrent aucune lésion manifeste (par exemple une perforation), et

— que la teneur moyenne en colorant du disque est inférieure (<) à la teneur moyenne en colorant du disque de contrôle positif (acide hydrochlorique 10 M) obtenue parallèlement (pour connaître les plages acceptables, se reporter au paragraphe 30).

On considère que le produit chimique d'essai est corrosif pour la peau:

i) si la valeur moyenne de la RET pour le produit chimique d'essai est inférieure ou égale (≤) à 5 kΩ, et que les disques de peau montrent des lésions manifestes (par exemple une perforation), ou

ii) si la valeur moyenne de la RET pour le produit chimique d'essai est inférieure ou égale (≤) à 5 kΩ, et

— que les disques de peau ne montrent aucune lésion manifeste (par exemple une perforation), mais

▼M8

— que la teneur moyenne en colorant du disque est supérieure ou égale (≥) à la teneur moyenne en colorant du disque de contrôle positif (acide hydrochlorique 10 M) obtenue parallèlement (pour connaître les plages acceptables, se reporter au paragraphe 30).

33. Une expérience réalisée à l'aide d'au moins trois réplicats de disques de peau devrait suffire pour tester un produit chimique dont la classification est sans équivoque. En revanche, dans le cas de résultats ambigus, tels que des mesures non concordantes pour les différents réplicats et/ou une RET égale à 5 ± 0,5 kΩ, une seconde expérience indépendante est envisagée, voire une troisième en cas de résultats discordants entre les deux premiers.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

34. Les valeurs de résistance (kΩ) et les valeurs de teneur en colorant (µg/disque), s'il y a lieu, pour le produit chimique d'essai et pour les contrôles positifs et négatifs doivent être présentées sous forme de tableau, et inclure les données de chaque réplicat de disque pour chaque expérience et les valeurs moyennes ± écart-type. Toutes les expériences reproduites doivent être consignées. Les lésions observées sur les disques de peau doivent être enregistrées pour chaque produit chimique d'essai.

Rapport d'essai

35. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Produit chimique d'essai et substances de contrôle:

— Substance mono-constituant: identification chimique, notamment désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent;

— Substance multi-constituants, UVCB ou mélange: caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;

— Apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;

— Source et numéro de lot si disponible;

— Traitement du produit chimique d'essai ou de la substance de contrôle avant la conduite de l'essai, s'il y a lieu (par exemple chauffage, broyage);

— Stabilité du produit chimique d'essai, date de péremption, ou date de vérification analytique si disponible;

— Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Animaux d'essai:

— Souche et sexe;

— âge au moment du prélèvement de peau;

— source, conditions d'hébergement, alimentation, etc.;

— détails de la préparation de la peau.

▼**M8**

Conditions de l'essai:

— courbes d'étalonnage de l'appareil d'essai;

— courbes d'étalonnage des performances de l'essai de fixation d'un colorant, passe-bande utilisé pour mesurer les valeurs de DO, et plage de linéarité de l'appareil de mesure (par exemple spectrophotomètre), le cas échéant;

— détails de la procédure d'essai utilisée pour les mesures de la RET;

— détails de la procédure d'essai utilisée pour l'évaluation de la fixation du colorant, le cas échéant;

— doses d'essai utilisées, durée de la ou des périodes d'exposition et température(s) d'exposition;

— détails de la procédure de lavage utilisée après la période d'exposition;

— nombre de réplicats de disques de peau utilisés par produit chimique d'essai et par substance de contrôle (négatif et positif);

— description de toute modification de la procédure d'essai;

— référence aux données historiques du modèle, à savoir (liste non limitative):

  i) acceptabilité des valeurs de RET des contrôles positif et négatif (en kΩ) par rapport aux plages de résistance des contrôles positif et négatif,

  ii) acceptabilité des valeurs de la teneur en colorant des contrôles positif et négatif (en µg/disque) par rapport aux plages de teneur en colorant des contrôles positif et négatif,

  iii) acceptabilité des résultats de l'essai par rapport à la variabilité historique entre réplicats de disques de peau;

— description des critères de décision/du modèle prédictif appliqués.

Résultats:

— présentation sous forme de tableau des valeurs de RET et de l'essai de fixation d'un colorant (le cas échéant), pour chaque produit chimique d'essai et substance de contrôle, pour chaque expérience et chaque réplicat de disque cutané (pour chaque animal et chaque échantillon de peau), moyennes, écarts-types et écarts-types relatifs;

— description de tous les effets observés;

— classification obtenue compte tenu du modèle prédictif/des critères de décision utilisés.

Discussion des résultats

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

▼**M8**

(2) Chapitre B.4 de la présente annexe, Effet irritant/corrosif aigu sur la peau.

(3) Chapitre B.40 *bis* de la présente annexe, Corrosion cutanée *in vitro*: Essai sur modèle de peau humaine.

(4) Chapitre B.65 de la présente annexe, Méthode d'essai *in vitro* sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée.

(5) Chapter B.46 of this Annex, Irritation cutanée *in vitro:* essai sur épiderme humain reconstitué.

(6) OCDE (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (N° 203), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.*ATLA* 23, 219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471-482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro*12, 483- 524.

(10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops.*ATLA*23, 129-147.

(11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

(14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(15) OCDE (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment N° 218. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

▼**M8**

(16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. Fd. Chem. *Toxicol.* 24, 507-512.

(17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., and Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro:* Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol*. *In Vitro* 6,191-194.

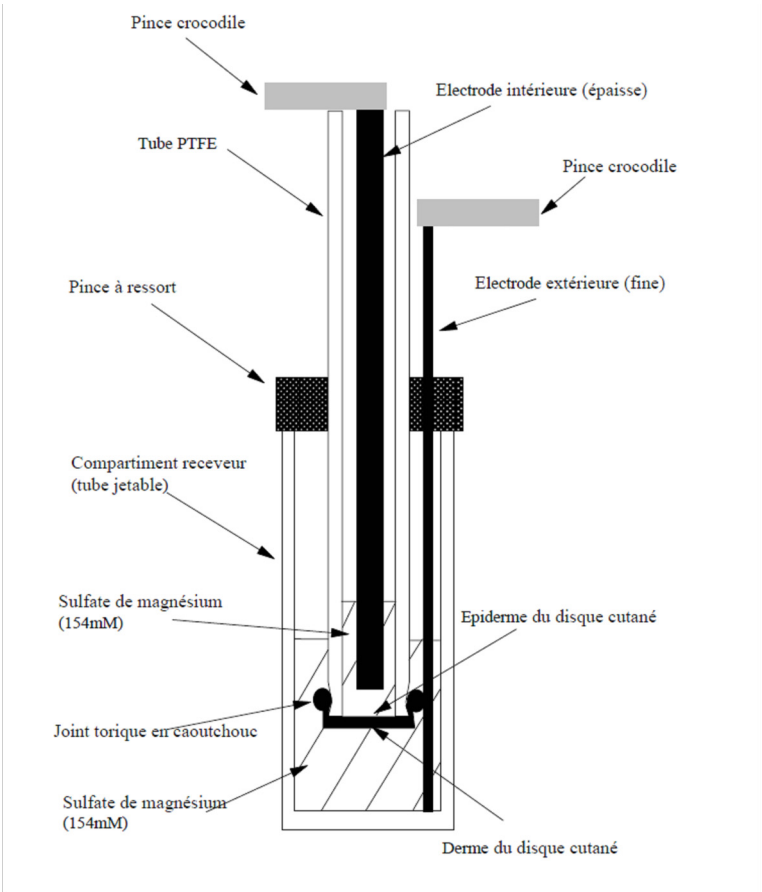
(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. and Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403.

(19) TER SOP (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.

(20) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

Figure 1

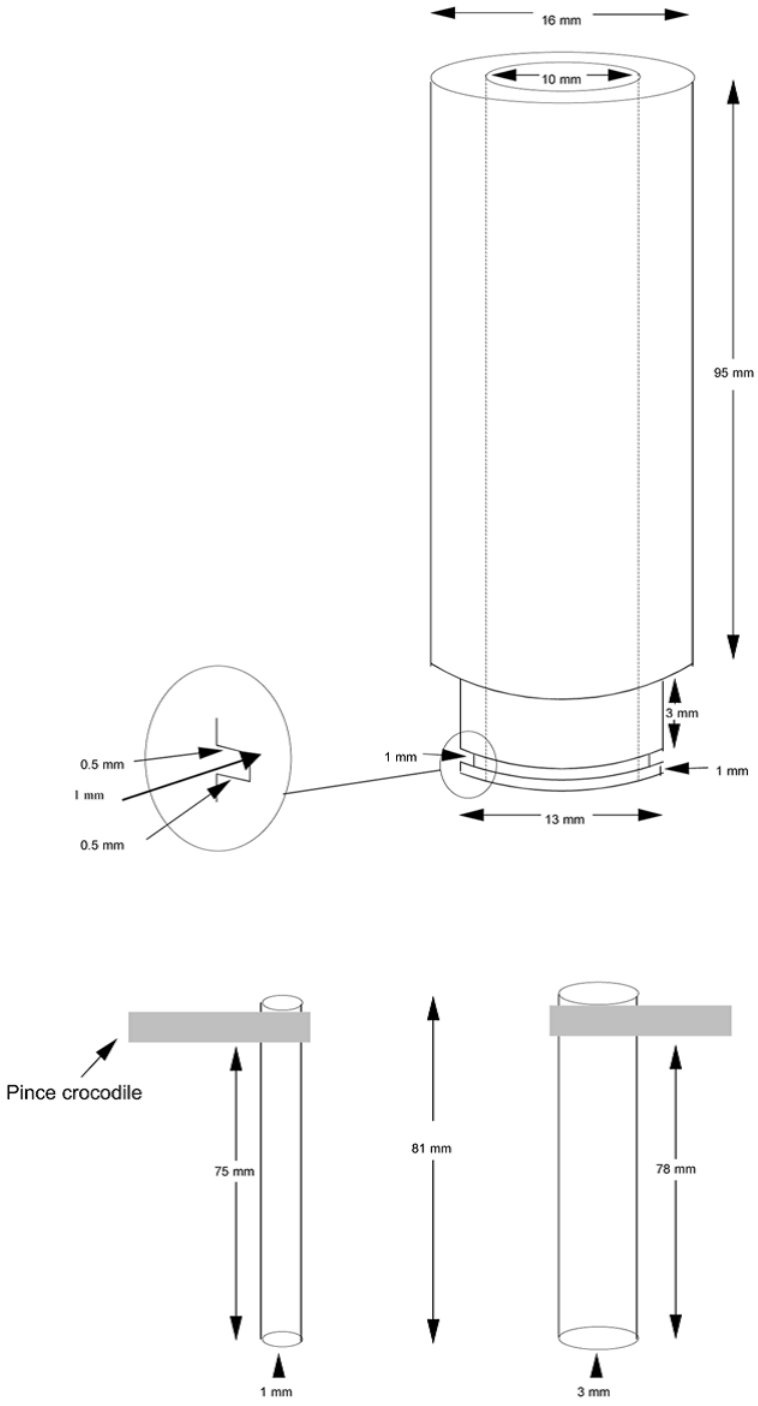
Appareil Pour L'essai de ret sur Peau de Rat



▼**M8**

Figure 2

Dimensions du tube PTFE (Polytétrafluoroéthylène), des Tubes receveurs et des Électrodes Utilisés



Facteurs importants pour l'appareil ci-dessus:

— diamètre intérieur du tube PTFE;

— longueur des électrodes par rapport au tube PTFE et au tube receveur: le disque cutané ne doit pas être en contact avec les électrodes, et une longueur standard d'électrode doit être en contact avec la solution de sulfate de magnésium;

▼**M8**

— quantité de solution de sulfate de magnésium dans le tube receveur: la profondeur de liquide, par rapport au niveau dans le tube PTFE, doit être telle qu'indiquée dans la figure 1;

— fixation du disque cutané sur le tube PTFE: la résistance électrique doit être véritablement une mesure des propriétés de la peau.

▼**M8**

Appendice 1

DÉFINITIONS

C: corrosif

Concordance: mesure de performance pour les méthodes d'essai produisant des résultats catégoriels. Elle constitue un des aspects de la pertinence. Ce terme est parfois utilisé indifféremment à la place de «précision », et se définit comme la proportion de tous les produits chimiques d'essai qui ont été correctement classés comme positifs ou négatifs. La concordance dépend étroitement de la prévalence des résultats positifs dans les types de produits chimiques d'essai (20).

Contrôle positif: réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai, et traité avec une substance induisant notoirement une réponse positive. Pour qu'il soit possible d'évaluer la variabilité dans le temps de la réponse du contrôle positif, l'intensité maximale de celle-ci ne doit pas être excessive.

Corrosion cutanée *in vivo*: survenue de lésions irréversibles de la peau. En l'occurrence, il s'agit de nécrose visible, à travers l'épiderme et jusque dans le derme, suite à l'application d'un produit chimique d'essai pendant une durée allant jusqu'à quatre heures. Les réactions corrosives se traduisent généralement par des ulcères, des saignements, des croûtes sanguinolentes et, à la fin de la période d'observation, soit à 14 jours, par une décoloration due au blanchissement de la peau, des zones complètes d'alopécie, et des cicatrices. Un examen histopathologique peut être envisagé pour évaluer les lésions sujettes à questionnement.

DO: densité optique

Expérience: consiste à tester un même produit chimique en parallèle sur au minimum trois réplicats de disques cutanés.

Fiabilité: mesure dans laquelle une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires (20).

IATA: Approches Intégrées pour les Essais et l'Évaluation (*Integrated Approaches to Testing and Assessment* en anglais)

Mélange: mélange ou solution composé d'au moins deux substances.

NC: non corrosif

Normes de performance: normes, fondées sur une méthode d'essai validée, permettant d'évaluer la comparabilité d'une méthode d'essai proposée, structurellement et fonctionnellement similaire. Elles comprennent: (i) les éléments essentiels de la méthode d'essai, (ii) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi ceux utilisés pour démontrer les performances acceptables de la méthode d'essai validée, et (iii) les niveaux de fiabilité et de précision similaires à ceux obtenus avec la méthode d'essai validée, que la méthode d'essai proposée doit présenter lorsqu'on l'évalue à l'aide des produits chimiques de référence de la liste minimale.

Pertinence: description de la relation entre la méthode d'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité à des fins spécifiques. Elle définit le degré auquel l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de «concordance » pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (20).

▼M8

Précision: degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa pertinence. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de «concordance » pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (20).

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode.

Résistance électrique transcutanée (RET): mesure de l'impédance électrique de la peau, exprimée par une valeur de résistance en kilo-Ohms. Il s'agit d'une méthode simple et fiable permettant d'évaluer la fonction de barrière de la peau, par l'enregistrement du passage des ions à travers la peau à l'aide d'un pont de mesure de Wheatstone.

Sensibilité: proportion des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par la méthode d'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (20).

SGH de l'ONU [Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies]: système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans le but de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (1).

Spécificité: roportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont correctement classés par la méthode d'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (20).

Substance: élément chimique et ses composés à l'état naturel ou obtenus par un processus de fabrication, y compris tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit et toute impureté résultant du processus mis en œuvre, à l'exclusion de tout solvant pouvant être séparé de la substance sans affecter sa stabilité ni modifier sa composition.

Substance mono-constituant: une substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle le constituant principal est présent à hauteur de 80 & au moins (m/v).

Substance multi-constituant: une substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant figure à une concentration supérieure ou égale à 10 % (m/v) and inférieure ou égale à 80 % (m/v). Une substance multi-constituant est le résultat d'un processus de manufacture. La différence entre un mélange et une substance multi-constituant est que le mélange est obtenu en mélangeant deux substances ou plus sans que celles-ci réagissent entre elles.Une substance multi-constituant est le résultat d'une réaction chimique.

UVCB: substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes et matières biologiques.

▼M8

B.40. *bis* CORROSION CUTANÉE IN VITRO: ESSAI SUR MODÈLE DE PEAU HUMAINE (RhE)

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 431 (2016) de l'OCDE. La corrosion cutanée désigne la survenue de lésions irréversibles de la peau, qui se manifestent par une nécrose visible, à travers l'épiderme et jusque dans le derme, suite à l'application d'un produit chimique d'essai [selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU) et du règlement (CE) n° 1272/2008 de l'Union européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (ci-après le «règlement CLP») ([1])] (1). La présente version mise à jour de la méthode d'essai B.40 *bis* propose une procédure *in vitro* permettant d'identifier les substances et mélanges corrosifs et non corrosifs selon la définition du SGH de l'ONU et du règlement CLP. Elle permet aussi une sous-catégorisation partielle des produits chimiques corrosifs.

2. Traditionnellement, l'évaluation du potential de corrosion cutanée par les produits chimiques a impliqué le recours à des animaux de laboratoire (méthode d'essai B.4, équivalente à la ligne directrice 404 de l'OCDE, initialement adoptée en 1981 et révisée en 1992, 2002 et 2015) (2). Outre la présente méthode d'essai B.40 *bis*, deux autres méthodes d'essai *in vitro* ont été validées et adoptées pour évaluer le potentiel de corrosion cutanée des produits chimiques, à savoir la méthode d'essai B.40 (équivalente à la ligne directrice 430 de l'OCDE) (3) et la méthode d'essai B.65 (équivalente à la méthode d'essai 435 de l'OCDE) (4). Par ailleurs, la méthode d'essai in vitro B.46 (équivalente à la ligne directrice 439 de l'OCDE) (5) a été adoptée pour le volet «irritation cutanée». Un document guide de l'OCDE sur les Approches Intégrées en matière d'Essai et d'Évaluation (IATA en anglais) pour l'irritation et la corrosion de la peau propose une approche modulaire pour les tests d'irritation et de corrosion de la peau. L'approche intégrée décrit plusieurs modules qui regroupent les sources d'information et les outils d'analyse, et fournit des guides sur la façon 1) d'intégrer et d'utiliser les informations existantes sur les données d'essai et autres données pour l'évaluation du potentiel irritant et corrosif pour la peau des produits chimiques d'essai, et 2) propose une approche dans les cas où des tests supplémentaires sont recommandés (6).

3. La présente méthode d'essai porte sur le danger de corrosion cutanée pour la santé humaine. Elle fait appel à un épiderme humain reconstitué (obtenu à partir de kératinocytes non transformés prélevés sur épiderme humain) qui reproduit fidèlement les propriétés histologiques, morphologiques, biochimiques et physiologiques des couches supérieures de la peau humaine, c'est-à-dire de l'épiderme. La ligne directrice équivalente de l'OCDE, initialement adoptée en 2004, avait été mise à jour en 2013 pour y inclure deux méthodes d'essai supplémentaires utilisant les modèles d'épiderme humain reconstitué, et la possibilité d'utiliser les méthodes pour faciliter la sous-catégorisation des produits chimiques corrosifs. La ligne directrice a de nouveau été mise à jour en 2015 pour y introduire la référence au Document guide IATA et une procédure alternative pour mesurer la viabilité cellulaire.

4. La présente méthode d'essai utilise quatre modèles d'épiderme humain reconstitué disponibles dans le commerce. Des études de prévalidation (7), suivies d'une étude formelle de validation pour l'évaluation de la corrosion cutanée (8) (9) (10), ont été menées (11)(12) sur deux de ces modèles d'essai disponibles dans le commerce, le modèle standard (SM) EpiSkin™ et l'essai de corrosion cutanée (SCT) EpiDerm™ (EPI-200) (désignées comme les méthodes de référence validées – MRV- dans le texte qui suit). Sur la base des résultats de ces études, il est désormais recommandé que ces

([1]) Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) no 1907/2006, JO L 353 du 31.12.2008, p. 1.

▼M8

deux MRV puissent servir, à des fins réglementaires, à distinguer les produits chimiques corrosifs (C) des produits chimiques non corrosifs (NC), et que la méthode EpiSkin™ puisse également être utilisée pour sous-catégoriser les produits chimiques corrosifs (13) (14) (15). Deux autres modèles d'essai d'irritation cutanée *in vitro* sur épiderme humain reconstitué, également disponibles dans le commerce, ont donné des résultats analogues à la MRV EpiDerm™ selon une validation fondée sur les normes de performance (16) (17) (18). Il s'agit des méthodes SkinEthic™ RHE ([1]) et epiCS® (précédemment connue sour le nom EST-1000), qui peuvent aussi servir à des fins réglementaires pour distinguer les produitss chimiques corrosifs des produits chimiques non corrosifs (19) (20). Des études post-validation réalisées entre 2012 et 2014 par les producteurs des modèles d'épiderme humain reconstitué, à l'aide d'un protocole affiné corrigeant les interférences causées par la réduction non spécifique du MTT par les produits chimiques d'essai, ont amélioré les performances, s'agissant aussi bien de la distinction entre produits chimiques corrosifs et non corrosifs que pour soutenir la sous-catégorisation des produits chimiques corrosifs (21)(22). Des analyses statistiques sur des données collectées après la validation et générées sur EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE et epiCS® ont permis d'identifier des modèles de prédiction alternatifs qui améliorent leur capacité de prédiction pour la sous-catégorisation (23).

5. Avant de pouvoir utiliser à des fins réglementaires une méthode d'essai *in vitro* de corrosivité cutanée sur épiderme humain reconstitué similaire ou modifiée autre que les MRV, il convient d'en déterminer la fiabilité, la pertinence (précision) et les limitations pour l'usage préconisé, afin de s'assurer de sa similitude avec les MRV, conformément aux normes de performance (24) établies suivant les principes du document guide de l'OCDE sur la validation N° 34 (25). L'acceptation mutuelle des données n'est garantie que dans la mesure où les méthodes d'essai nouvelles ou mises à jour conformément aux normes de performances ont été examinées et intégrées dans la ligne directric d'essai correspondante. Les modèles d'essai inclus dans cette ligne directrice peuvent être utilisés pour répondre aux exigences des pays en matière d'essais *in vitro* de corrosion cutanée, tout en bénéficiant de l'acceptation mutuelle des données.

DÉFINITIONS

6. Les définitions utilisées figurent à l'appendice 1.

CONSIDÉRATIONS INITIALES

7. La présente méthode d'essai permet d'identifier les substances et mélanges corrosifs et non corrosifs selon la définition du SGH de l'ONU et du règlement CLP. Cette méthode d'essai autorise en outre à sous-catégoriser les substances et mélanges corrosifs, en les classant dans la sous-catégorie facultative 1A telle que définie par le SGH de l'ONU (1), ou dans les sous-catégories 1B et 1C combinées (21)(22)(23). Une limite de cette méthode d'essai est qu'elle ne permet pas d'établir de distinction entre les sous-catégories de corrosivité cutanée 1B et 1C du SGH de l'ONU et du CLP, en raison du nombre limité de produits chimiques corrosifs *in vivo* de sous-catégorie 1C bien connus. Les modèles d'essai EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ et epiCS® sont à même de permettre une sous-catégorisation (1A vs 1B et 1C vs substances non corrosives (NC)).

8. Un large éventail de produits chimiques, constitué principalement de substances individuelles, a été testé durant l'étude de validation des modèles d'essai proposés dans cette méthode d'essai pour une utilisation à des fins d'identification des substances corrosives et non corrosives; la base de données empiriques de l'étude de validation totalisait 60 produits chimiques couvrant une grande variété de classes chimiques (8) (9) (10). Les tests

([1]) L'abbréviation RhE (= Reconstructed human Epidermis) est utilisée pour tous les modèles basés sur la technologie RhE. L'abbréviation RHE utilisée conjointement avec le modèle SkinEthic™ signifie la même chose, mais faisant partie intégrante du nom de cette méthode telle que commercialisée, s'épelle en lettre capitales.

▼M8

visant à démontrer la sensibilité, la spécificité, la précision et la reproductibilité intra-laboratoire de l'essai de sous-catégorisation ont été réalisés par les développeurs de chaque méthode d'essai et leurs résultats ont été examinés par l'OCDE (21) (22) (23). D'après l'ensemble des données disponibles, la méthode d'essai peut être utilisée pour tester un large éventail de classes chimiques et d'états physiques, notamment des liquides, des semi-solides, des solides et des cires. Les liquides peuvent être aqueux ou non; les solides peuvent être solubles ou insolubles dans l'eau. Si possible, les solides sont moulus finement avant application; aucun autre traitement préalable de l'échantillon n'est nécessaire. Dans les cas où l'on peut apporter la preuve que les modèles d'essai de la présente méthode d'essai ne peuvent s'appliquer à une catégorie donnée de substances, il convient de ne pas les utiliser pour tester la catégorie de substances en question. De plus, outre les substances, cette méthode d'essai directrice est censée pouvoir s'appliquer aux mélanges. Or, les mélanges couvrant un large éventail de catégories et de compositions, et compte tenu des informations limitées disponibles actuellement à propos des essais de mélanges, dans les cas où l'on peut apporter la preuve que cette méthode d'essai ne peut s'appliquer à une catégorie donnée de mélanges (par exemple selon la stratégie proposée dans (26)), la méthode d'essai ne doit pas être utilisée pour tester la catégorie de mélanges en question. Les gaz et les aérosols n'ont pas encore fait l'objet d'études de validation (8) (9) (10). Avant d'utiliser la présente méthode d'essai pour tester un mélange afin de générer des données dans un but réglementaire, il convient de s'assurer et de justifier le cas échéant, que les données générées seront adéquates. De telles dispositions ne sont pas nécessaires quand il existe une exigence réglementaire de tester le mélange. Les gaz et les aérosols n'ont pas encore fait l'objet d'études de validation (9) (10). Bien qu'il soit envisageable de tester des gaz et des aérosols en faisant appel à de l'épiderme humain reconstitué, l'actuelle méthode d'essai ne permet pas de tester les produits de ce type.

9. Les produits chimiques d'essais absorbant la lumière dans la même gamme que le MTT formazan et les produits chimiques d'essais capables de réduire de façon directe le colorant vital MTT (en MTT formazan) peuvent interférer avec les mesures de viabilité cellulaire et nécessitent l'utilisation de témoins adaptés pour effectuer la correction de ces interférences. Le type de témoins adaptés qui peuvent être requis peut varier en fonction du type d'interférences produites par le produit chimique d'essai et de la procédure mise en œuvre pour mesurer le MTT formazan (voir paragraphes 25-31).

10. Si la présente méthode d'essai ne fournit pas d'informations appropriées sur l'irritation cutanée, on notera cependant que la méthode d'essai B.46 porte spécifiquement sur les essais d'irritation cutanée *in vitro* et, bien que faisant appel à un protocole différent, est basée sur le même système d'essai sur épiderme humain reconstitué (5). Pour une évaluation complète des effets cutanés locaux après une exposition unique, il est recommandé de consulter le document guide de l'OCDE sur les Approches Intégrées pour les Essais et l'Evaluation (*IATA* en anglais) (6). Cette approche IATA prévoit la conduite d'essais *in vitro* de corrosion cutanée (tels que décrits dans la présente méthode d'essai) et d'irritation cutanée avant d'envisager des essais sur des animaux vivants. Il est entendu que l'utilisation de peau humaine est soumise à des conditions et considérations d'éthique nationales et internationales.

PRINCIPE DE L'ESSAI

11. Le produit chimique d'essai est appliqué localement sur un modèle tridimensionnel d'épiderme humain reconstitué, composé de kératinocytes non transformés prélevés sur épiderme humain et mis en culture pour former un modèle multicouche hautement différencié d'épiderme humain. Ce modèle se compose de couches organisées (basale, épineuse et granuleuse), ainsi que d'un *stratum corneum* multicouche contenant des couches lipidiques lamellaires intercellulaires représentant les principales classes de lipides, semblables à celles que l'on observe *in vivo*.

▼M8

12. La méthode d'essai sur épiderme humain reconstitué part du principe que les substances corrosives sont capables de pénétrer dans le *stratum corneum* (couche cornée) par diffusion ou érosion, et sont cytotoxiques pour les cellules des couches sous-jacentes. La viabilité cellulaire est mesurée via la conversion enzymatique du colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, bromure de tétrazolium; numéro CAS 298-93-1] en un sel de formazan bleu mesuré quantitativement après son extraction des tissus (27). Les substances corrosives sont mises en évidence par leur capacité à faire chuter la viabilité cellulaire sous un seuil prédéterminé (voir paragraphes 31 et 32). Dans la pratique, la méthode d'essai de corrosion cutanée sur épiderme humain reconstitué s'est révélée fiable pour prédire la corrosion cutanée *in vivo* sur le lapin selon la méthode d'essai B.4 (2).

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

13. Avant d'appliquer en routine l'un des quatre modèles validés d'essai sur épiderme humain reconstitué conformément à la présente méthode d'essai, les laboratoires doivent faire la preuve de leur compétence technique en classifiant correctement les douze produits énumérés au tableau 1. S'ils utilisent une méthode de sous-classification, l'exactitude de la sous-catégorisation doit également être démontrée. Dans le cas où une substance figurant dans le tableau 1 serait indisponible, où dans d'autres cas où il est justifié de la remplacer par une autre substance (par exemple à partir de la liste de substances de référence (24)), cette autre substance peut être utilisée si des données de référence appropriées *in vivo* et *in vitro* sont disponibles, et dans la mesure où les mêmes critères de sélection que ceux décrits sous le tableau 1 sont utilisés.

Tableau 1

Liste des Substances d'épreuve de compétence ([1])

Substance ([2])	Numéro CAS	Classe chimique ([2])	Cat. SGH de l'ONU/CLP d'après les résultats *in vivo* ([3])	Cat MVR d'après les résultats *in vitro* ([4])	Agent réducteur du MTT ([5])	État physique
Substances corrosives *in vivo* de sous-catégorie 1A						
Acide bromoacétique	79-08-3	acide organique	1A	(3) 1A	—	S.
Trifluorure de bore dihydraté	13319-75-0	acide inorganique	1A	(3) 1A	—	L.
Phénol	108-95-2	phénol	1A	(3) 1A	—	S.
Chlorure de dichloroacétyle	79-36-7	électrophile	1A	(3) 1A	—	L.
Combinaison de substances corrosives *in vivo* de sous-catégorie 1B-et-1C						
Acide glyoxylique monohydraté	563-96-2	acide organique	1B-et-1C	(3) 1B-et-1C	—	S.
Acide lactique	598-82-3	acide organique	1B-et-1C	(3) 1B-et-1C	—	L
Ethanolamine	141-43-5	base organique	1B	(3) 1B-et-1C	O	V.

▼**M8**

Substance ([2])	Numéro CAS	Classe chimique ([2])	Cat. SGH de l'ONU/CLP d'après les résultats *in vivo* ([3])	Cat MVR d'après les résultats *in vitro* ([4])	Agent réducteur du MTT ([5])	État physique
Substances corrosives *in vivo* de sous-catégorie 1A						
Acide chlorhydrique	7647-01-0	acide inorganique	1B-et-1C	(3) 1B-et-1C	—	L.
Substances non corrosives *in vivo*						
Bromure de phénétyle	103-63-9	électrophile	NC	(3) NC	O	L
4-amino-1,2,4-triazole	584-13-4	base organique	NC	(3) NC	_	S.
4-(méthylthio)-benzaldéhyde	3446-89-7	électrophile	NC	(3) NC	O	L
Acide laurique	143-07-7	acide organique	NC	(3) NC	_	S.

Abréviations: CAS = numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service; MRV = méthode de référence validée; NC= non corrosif, O = oui; S = solide; L = liquide

([1]) Les substances d'épreuve de compétence d'abord classées en substances corrosives et non corrosives, puis par sous-catégorie de substances corrosives, puis par classe chimique, ont été choisies parmi les substances utilisées dans les études de validation d'EpiSkin™ et d'EpiDerm™ du CEVMA (8) (9) (10) et dans les études post-validation s'appuyant sur les données fournies par les développeurs de EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ et epiCS®. Sauf indication contraire, les substances ont été testées au niveau de pureté qui était le leur lors de l'achat auprès de la source commerciale (8) (10). Cette sélection inclut, dans la mesure du possible, des substances qui: (i) sont représentatives de la gamme des réactions de corrosion provoquées (par exemple non corrosives; faiblement à fortement corrosives) que les MRV sont capables de mesurer ou de prévoir; (ii) sont représentatives des classes chimiques utilisées dans les études de validation; (iii) ont une structure chimique bien définie; (iv) permettent d'obtenir des résultats reproductibles avec la MRV; (v) permettent d'obtenir des résultats définitifs avec la méthode d'essai in vivo de référence; (vi) sont disponibles dans le commerce et (vii) ne sont pas associées à des coûts d'élimination prohibitifs.

([2]) Classe chimique assignée par Barratt et al. (8).

([3]) Les groupes d'emballage de l'ONU correspondants sont les groupes I, II et III respectivement pour les catégories 1A, 1B et 1C du SGH de l'ONU/CLP.

([4]) Les prédictions in vitro de la MRV consignées dans le tableau ont été obtenues avec les modèles d'essai EpiSkin™ et EpiDerm™ (MRV) au cours d'essais ultérieurs post-validation réalisés par les développeurs de la méthode d'essai.

([5]) Les valeurs de viabilité obtenues dans l'étude de validation pour la corrosion de la peau du CEVMA n'ont pas été corrigées pour la réduction MTT directe (aucun témoins sur tissus morts n'a été réalisé lors de l'étude de validation). Cependant, les données post-validation obtenues par le développeur de la méthode d'essai qui sont présentées dans ce tableau ont été obtenues avec des témoins adaptés (23).

14. Dans le cadre de la démonstration des compétences, il est recommandé à l'utilisateur de contrôler les propriétés de barrière des tissus dès réception, comme précisé par le producteur du modèle d'épiderme humain reconstitué. Cette étape est particulièrement importante lorsque les tissus sont transportés sur de longues distances/durées. Lorsqu'une méthode d'essai a été établie avec succès, et que le laboratoire a démontré sa maîtrise de cette méthode, il ne sera plus nécessaire de procéder systématiquement à cette vérification. Toutefois, pour les méthodes d'essai utilisées en routine, il est recommandé de continuer à évaluer les propriétés de barrière des tissus à intervalles réguliers.

PROCÉDURE

15. Les paragraphes qui suivent offrent une description générique des éléments et des procédures des modèles d'essai de corrosion cutanée sur épiderme humain reconstitué utilisés dans la présente méthode d'essai. Les modèles d'épiderme humain reconstitué considérés comme scientifiquement valides à utiliser dans cette méthode d'essai, à savoir les modèles EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE et epiCS® (16) (17) (19) (28) (29) (30) (31) (32) (33), sont disponibles dans le commerce. Il existe des modes opératoires normalisés pour ces quatre modèles d'épiderme humain reconstitué (34) (35) (36), et les principaux éléments de leur méthode d'essai sont

▼M8

résumés à l'appendice 2. Il est recommandé de consulter le mode opératoire normalisé pertinent lors de la mise en œuvre et de l'utilisation d'un de ces modèles en laboratoire. Les essais réalisés avec les quatre modèles d'essai sur épiderme humain reconstitué prévus par la méthode d'essai doivent respecter les éléments suivants:

ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI SUR ÉPIDERME HUMAIN RECONSTITUÉ

Conditions générales

16. L'épithélium est reconstruit à partir de kératinocytes humains non transformés. Plusieurs couches de cellules épithéliales viables (couche basale, stratum spinosum, stratum granulosum) doivent être présentes sous un stratum corneum fonctionnel. Le stratum corneum doit comporter plusieurs couches présentant le profil lipidique nécessaire pour constituer une barrière fonctionnelle suffisamment robuste pour résister à la pénétration rapide des substances marqueurs cytotoxiques telles que le dodécylsulfate de sodium (SDS) ou le Triton X-100. La fonction de barrière doit être démontrée et peut être évaluée soit en déterminant la concentration à laquelle une substance marqueur réduit la viabilité des tissus de 50 % (CI50) après un temps d'exposition donné, soit en définissant le temps d'exposition requis pour réduire la viabilité des cellules de 50 % (TE50) après application de la substance marqueur à une concentration fixe déterminée (voir paragraphe 18). Le modèle d'épiderme humain reconstitué doit présenter des propriétés de confinement suffisantes pour éviter que de la matière puisse contourner le stratum corneum pour atteindre les tissus viables, ce qui nuirait à la qualité de la modélisation de l'exposition cutanée. Enfin, le modèle doit être exempt de toute contamination bactérienne, virale, mycoplasmique ou mycosique.

Conditions fonctionnelles

Viabilité

17. La quantification de la viabilité cellulaire est mesurée au moyen du colorant MTT (27). Les cellules viables du modèle d'épiderme humain reconstitué réduisent le colorant vital MTT en un précipité bleu de sel de formazan., qui est ensuite extrait des tissus au moyen de l'isopropanol (ou d'un solvant similaire). La densité optique du solvant d'extraction seul doit être suffisamment faible, c'est-à-dire inférieure à 0,1. Le MTT formazan extrait peut être quantifié soit en mesurant l'absorbance standard (DO), ou une procédure de spectrophotométrie HPLC-UPLC (38). Les utilisateurs du modèle d'épiderme humain reconstitué doivent faire en sorte que chaque lot utilisé réponde aux critères définis pour le témoin négatif. Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour le témoin négatif doit être établie par le développeur/fournisseur du modèle d'épiderme humain reconstitué. Les plages d'acceptabilité des valeurs de densité optique pour les témoins négatifs des quatre modèles d'essai sur épiderme humain reconstitué validés figurant dans cette méthode d'essai sont indiquées dans le tableau 2. L'utilisateur de spectrophotométrie HPLC-UPLC devra utiliser la plage de densité optique des témoins négatifs fournie au tableau 2 comme critère d'acceptabilité du témoin négatif. Il est démontré que les tissus traités par le témoin négatif sont stables en culture (c'est-à-dire qu'ils présentent des mesures de DO similaires) tout au long de la période d'exposition.

Tableau 2

Plages d'acceptabilité des valeurs de DO du témoin négatif pour contrôler la qualité du lot

	Valeur limite inférieure	Valeur limite supérieure
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

▼M8

Fonction de barrière

18. Le *stratum corneum* et sa composition lipidique doivent être suffisants pour résister à la pénétration rapide de certains produits chimiques marqueurs cytotoxiques tels que le SDS ou le Triton X-100, cette capacité étant évaluée par la CI_{50} et le TE_{50} (voir tableau 3). La fonction de barrière de chaque lot de modèle de peau reconstituée doit être démontrée par le développeur/fournisseur au moment de la fourniture des tissus à l'utilisateur final (voir paragraphe 21).

Morphologie

19. L'examen histologique du modèle d'épiderme humain reconstitué doit mettre en évidence une structure multicouche semblable à celle de l'épiderme humain (comprenant un *stratum basale*, un *stratum spinosum*, un *stratum granulosum* et un *stratum corneum*) ainsi qu'un profil lipidique semblable à celui de l'épiderme humain. L'examen histologique de chaque lot de modèle de peau reconstituée utilisé, démontrant une morphologie adéquate des tissus, doit être fourni par le développeur/fournisseur au moment de la livraison des tissus à l'utilisateur final (voir paragraphe 21).

Reproductibilité

20. Les utilisateurs des méthodes d'essai doivent démontrer la reproductibilité dans le temps des résultats obtenus à l'aide des témoins positifs et négatifs. De plus, il ne faut utiliser la méthode d'essai que si le développeur/fournisseur du modèle d'épiderme humain reconstitué fournit des données démontrant sa reproductibilité dans le temps à l'aide de produits chimiques corrosifs et non corrosifs figurant par exemple sur la liste des produits chimiques d'épreuve (tableau 1). Si l'on utilise une méthode d'essai à des fins de sous-catégorisation, il convient de démontrer aussi la reproductibilité de cette sous-classification.

Contrôle de qualité

21. Le modèle d'épiderme humain reconstitué ne doit être utilisé que si le développeur/fournisseur démontre que chaque lot utilisé répond à des critères de fabrication définis, dont les plus pertinents sont ceux relatifs à la *viabilité* (paragraphe 17), à la *fonction de barrière* (paragraphe 18) et à la *morphologie* (paragraphe 19). Ces informations sont communiquées aux utilisateurs afin qu'ils puissent les inclure dans le rapport d'essai. Seuls les résultats obtenus à l'aide de lots de tissus ayant subi avec succès le contrôle de qualité pourront être retenus pour prédire de façon fiable la classification de la corrosivité. Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour les valeurs CI_{50} ou TE_{50} est établie par le développeur/fournisseur d'épiderme humain reconstitué. Les plages d'acceptabilité pour les quatre modèles d'essai validés sont indiquées dans le tableau 3.

Table 3

Critères de contrôle de qualité des lots

	Valeur limite inférieure	Valeur limite supérieure
EpiSkin™ (SM) (18 heures de traitement par SDS) (33)	CI_{50} = 1,0 mg/ml	CI_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (Triton X-100 à 1 %) (34)	TE_{50} = 4,0 heures	TE_{50} = 8,7 heures
SkinEthic™ RHE (Triton X-100 à 1 %)(35)	TE_{50} = 4,0 heures	TE_{50} = 10,0 heures
epiCS® (Triton X-100 à 1 %)(36)	TE_{50} = 2,0 heures	TE_{50} = 7,0 heures

▼M8

Application des produits chimiques d'essai et des produits chimiques témoins

22. Il convient d'utiliser au minimum deux réplicats de tissus par période d'exposition pour chaque produit chimique d'essai et substance témoin. Pour les produits chimiques liquides comme pour les produits chimiques solides, il convient d'appliquer une quantité suffisante de prodtuit chimiques pour recouvrir uniformément la surface de la peau, sans pour autant utiliser une dose infinie, c'est-à-dire au minimum 70 µl/cm^2 ou 30 mg/cm^2. Selon les modèles, il convient d'humidifier la surface de l'épiderme avec de l'eau déionisée ou distillée avant application de produits chimiques solides, afin d'assurer un bon contact entre le prodtuit chimique et la surface de l'épiderme (34) (35) (36) (37). Chaque fois que possible, il convient de tester les solides sous la forme d'une poudre fine. La méthode d'application doit convenir au produit chimique d'essai (voir par exemple les références 34 à 37). À la fin de la période d'exposition, l'épiderme doit être nettoyé avec soin à l'aide d'un tamponaqueux ou de NaCl à 0,9 %. En fonction du modèle validé utilisé, deux ou trois périodes d'exposition sont nécessaires par produit chimique d'essai (pour les quatre modèles validés d'épiderme humain reconstitué: 3 min et 1 heure; pour EpiSkin™, une période d'exposition supplémentaire de 4 heures). Selon le modèle d'essai utilisé et la période d'exposition évaluée, la température d'incubation peut varier entre la température ambiante et 37 °C.

23. Des témoins négatifs et positifs sont utilisés simultanément pour chaque épreuve afin de démontrer que la viabilité (dans le cas des témoins négatifs), la fonction de barrière et la sensibilité cellulaire qui en résulte (dans le cas du témoin positif) se situent dans une fourchette de valeurs admissibles, définie d'après les résultats historiques. Les substances de témoin positif recommandées sont l'acide acétique glacial ou l'hydroxyde de potassium 8N en fonction du modèle d'épiderme humain reconstitué mis en œuvre. Il convient de noter que l'hydroxyde de potassium 8N est un agent réducteur direct du MTT, qui peut nécessiter l'utilisation de témoins adaptés décrits aux paragraphes 25 et 26. Les témoins négatifs recommandés sont une solution NaCl à 0,9 % (p/v) ou de l'eau.

Mesures de la viabilité cellulaire

24. Il convient de recourir au test MTT, qui est un essai quantitatif, pour mesurer la viabilité cellulaire dans le cadre de cette méthode d'essai (27). L'échantillon de tissu est placé dans une solution MTT à la concentration appropriée (0,3 ou 1 mg/ml) pendant 3 heures. Le précipité bleu de formazan est ensuite extrait à l'aide d'un solvant (par exemple isopropanol, isopropanol acide), et l'on mesure la concentration du formazan en déterminant sa DO à 570 nm à l'aide d'un filtre passe-bande de ±30 nm au maximum, ou par une procédure de spectrophotométrie HPLC-UPLC (voir paragraphes 30 et 31) (38).

25. Les produits chimiques d'essai sont susceptibles d'interférer avec le test MTT, par réduction directe du MTT en formazan bleu, et/ou par interférence de couleurs si le produit chimique d'essai absorbe, naturellement ou sous l'effet des procédures du traitement, dans la même plage de densité optique que le formazan (570 ± 30 nm, produits chimiques principalement bleus et violets). Des contrôles ou témoins supplémentaires doivent être utilisés pour détecter et corriger les interférences potentielles avec ces produits chimiques d'essai , tel qu'un témoin de réduction non-spécifique du MTT (MTT NS) et un témoin coloré non-speçifique (T NS) (voir paragraphes 26 à 30). Cela est particulièrement important lorsque le produit chimique d'essai n'a pas été totalement éliminé du tissu par rinçage ou lorsqu'il a pénétré dans l'épiderme, et est donc présent dans les tissus lors de l'essai de viabilité au MTT. On trouvera une description détaillée de la manière de corriger la réduction directe du MTT ou les interférences dues aux agents colorants dans le mode opératoire normalisé des méthodes d'essai (34) (35) (36) (37).

▼**M8**

26. Afin d'identifier les agents réducteurs directs du MTT, il convient d'ajouter chaque produit chimique d'essai à un milieu MTT fraîchement préparé (34) (35) (36) (37). Si le mélange de MTT et de produit chimique d'essai (ou la suspension testée pour les produits chimiques d'essais insolubles) devient bleu/violet, on considère que le produit chimique d'essai est un réducteur direct du MTT et il convient alors de procéder à des vérifications fonctionnelles supplémentaires sur les modèles d'épithélium humain reconstruit non viables, indépendamment du choix de mesurer l'absorbance (OD) ou de procéder par analyse par HPLC/UPLC-spectrophotométrie. Cette vérification s'effectue sur des tissus tués qui ne présentent qu'une activité métabolique résiduelle, mais absorbent et retiennent le produit chimique d'essai dans des proportions similaires aux tissus viables. Chaque produit chimique réducteur du MTT est appliqué sur au moins deux réplicats de tissus tués qui sont soumis à la méthode d'essai complète de corrosion de la peau. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit: le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au réducteur du MTT (%viabilité$_{test}$) moins le pourcentage de réduction non spécifique du MTT obtenu pour les tissus tués exposés au même réducteur du MTT et calculé en proportion du témoin négatif testé en parallèle de l'essai à corriger (%MTT NS), soit Viabilité tissulaire réelle = [%viabilité$_{test}$] - [%MTT NS].

27. Pour repérer les interférences potentielles par des produits chimiques d'essai colorés ou qui deviennent colorés en contact avec l'eau ou l'isopropanol, et pour déterminer si des témoins supplémentaires sont nécessaires, une analyse de spectre est menée sur les produits chimiques dans l'eau (environnement au moment de l'exposition) et/ou dans l'isopropanol (solvant d'extraction). Si le produit chimique d'essai dans l'eau et/ou dans l'isopropanol absorbe assez la lumière à une longueur d'onde de 570 ± 30 nm, alors on considère que le produit chimique d'essai interfère avec la mesure de l'absorbance (DO) du formazan et des témoins colorés doivent être préparés, ou bien une procédure d'analyse par HPLC/UPLC-spectrophotométrie est employée et aucun témoin supplémentaire n'est nécessaire (voir paragraphes 30 et 31). Lorsque les mesures d'absorbance (DO) sonteffectuées, chaque produit chimique d'essai causant une interférence est appliqué sur au moins deux réplicats de tissus viables, et les deux réplicats sont soumis à la procédure d'essai complète de corrosion de la peau, à la seule différence qu'ils sont incubés dans le milieu plutôt que dans la solution MTT lors de l'étape de l'incubation avec MTT, afin de générer un témoin de couleur non spécifique dans les tissus vivants ($T_{vivants}$ NS). Le témoin $T_{vivants}$ NS est testé en parallèle de l'essai avec le produit chimique d'essai coloré et, dans le cas d'un essai multiple, un témoin $T_{vivants}$ NS indépendant est effectué pour chaque essai (dans chaque épreuve) pour tenir compte de la variabilité biologique inhérente aux tissus vivants. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit: le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au produit chimique causant une interférence et incubés avec la solution MTT (%viabilité$_{test}$) moins le pourcentage de couleur non spécifique obtenu pour les tissus vivants exposés au produit chimique causant une interférence et incubés dans du milieu sans MTT en parallèle de l'essai à corriger (%$T_{vivants}$ NS), soit Viabilité tissulaire réelle = [%viabilité$_{test}$] – [%$T_{vivants}$ NS].

28. Dans le cas des produits chimiques identifiés comme causant à la fois une réduction directe du MTT (voir paragraphe 26) et une interférence de couleurs (voir paragraphe 27), une troisième série de témoins est nécessaire lors de la mesure de l'absorbance (DO), en plus des témoins MTT NS et $T_{vivants}$ NS décrits aux paragraphes précédents. En général, ce cas se présente pour les produits chimiques d'essai foncés (bleus, violets, noirs, par exemple), car leur couleur intrinsèque empêche l'évaluation de leur potentiel de réduction directe du MTT décrite au paragraphe 26. Les produits chimiques d'essai sont susceptibles d'être absorbés et retenus à la fois par les tissus vivants et par les tissus tués. Par conséquent et dans ce cas, l'utilisation du témoin MTT NS peut permettre de corriger l'essai non seulement en fonction du potentiel de réduction directe du MTT du produit chimique d'essai, mais aussi de l'interférence de couleurs due à l'absorption et la rétention du produit chimique d'essai par les tissus tués. Cela signifie qu'une double correction pour tenir compte de l'interférence de couleurs peut devoir être effectuée, étant donné que le témoin $T_{vivants}$ NS permet déjà de tenir compte de l'interférence de couleurs due à l'absorption et à la rétention du produit

▼M8

chimique d'essai par les tissus vivants. Afin d'éviter cette double correction pour tenir compte de l'interférence de couleurs, un troisième témoin pour la couleur non spécifique dans les tissus tués (T_{morts} NS) doit être préparé. Dans ce témoin supplémentaire, le produit chimique d'essai est appliqué sur au moins deux réplicats de tissus tués qui sont soumis à la procédure d'essai complète mais qui sont incubés dans le milieu plutôt que dans la solution MTT lors de l'étape d'incubation avec MTT. Un seul témoin T_{morts} NS par produit chimique d'essai suffit, indépendamment du nombre d'épreuves, mais il doit être mené en parallèle du témoin NSMTT et sur le même lot de tissus. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit: le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au produit chimique d'essai (%viabilité$_{test}$) moins %NSMTT moins % $T_{vivants}$ NS plus le pourcentage de couleur non spécifique obtenu pour les tissus tués exposés au produit chimique d'essai causant une interférence et incubés dans du milieu sans MTT, calculé en proportion du témoin négatif mené en parallèle de l'essai à corriger (%T_{morts} NS), soit Viabilité tissulaire réelle = [%viabilité$_{test}$] - [%MTT NS] - [%$T_{vivants}$ NS] + [%T_{morts} NS].

29. Il importe de noter qu'une réduction non spécifique du MTT et des interférences de couleurs non spécifiques peuvent porter l'absorbance (DO) de l'extrait tissulaire au-dessus de la plage de linéarité du spectrophotomètre. Il est donc important que chaque laboratoire détermine la plage de linéarité de son spectrophotomètre (pour la DO/surface de pic), par exemple à l'aide de formazan (CAS # 57360-69-7), disponible dans le commerce, avant de tester les produits chimiques à des fins réglementaires. Les mesures d'absorbance standard (DO) au moyen d'un spectrophotomètre sont pertinentes pour évaluer les réducteurs directs du MTT et les produits chimiques d'essai colorés quand la DO des extraits de tissus traités par le produit chimique d'essai sans correction pour la réduction directe du MTT et/ou pour les interférences de couleur sont dans la plage de linéarité du spectrophotomètre ou quand le pourcentage de viabilité non-corrigée obtenu avec le produit chimique d'essai le classe déjà comme corrosif (voir paragraphes 35 et 36). Néanmoins, les résultats pour les produits chimiques d'essai indiquant % MTT NS et/ou $T_{vivants}$ NS $\geq$ 50 % du témoin négatif doivent être interprétés avec précaution.

30. Pour les produits chimiques d'essai colorés qui ne sont pas compatibles avec la mesure de l'absorbance standard (DO) à cause de leur forte interférence avec l'essai de MTT, peuvent être évalués par une procédure de HPLC/UPLC-spectrophotométrie (voir paragraphe 31) (38). Le système HPLC/UPLC permet de séparer le formazan du produit chimique avant la quantification (38). Pour cette raison, les témoins $T_{vivants}$ NS et T_{morts} NS ne sont pas nécessaires pour la procédure HPLC/UPLC-spectrophotométrie, quel que soit le produit chimique d'essai. Les témoins MTT NS sont néanmoins nécessaires si l'on s'attend à ce que le produit chimique d'essai soit un réducteur direct du MTT, ou que la couleur empêche l'évaluation de leur potentiel de réduction directe duMTT (en suivant la procédure décrite au paragraphe 26). Lorsqu'une procédure par HPLC/UPLC-spectrophotométrie est employée pour quantifier le formazan, la viabilité tissulaire est calculée en pourcentage par comparaison de la surface de pic de formazan obtenue avec des tissus vivants exposés au produit chimique d'essai avec la surface de pic de formazan obtenue avec le témoin négatif parallèle. Pour les produits chimiques d'essai réducteurs directs du MTT, la viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit: %viabilité$_{test}$ moins %MTT NS. Pour finir, il convient de noter que les réducteurs directs du MTT ou les réducteurs directs du MTT causant aussi une interférence de couleurs, qui sont retenus dans les tissus après le traitement et dont la capacité de réduction du MTT est telle qu'elle conduit à des DO (pour la mesure de DO) ou à des surfaces de pic (pour la procédure CLHP/CLUP-spectrophotométrie) des extraits tissulaires testés situées en-dehors de la plage de linéarité du spectrophotomètre, ne peuvent pas être évalués; ce cas ne se présente a priori que très rarement.

▼M8

31. La procédure par HPLC/UPLC-spectrophotométrie est utilisable pour mesurer le formazan pour tous les types de produits chimiques (colorés ou non, réducteurs ou non réducteurs du MTT) (38). Étant donné la diversité des équipements de HPLC/UPLC -spectrophotométrie, tous les utilisateurs ne pourront pas reproduire des conditions d'équipement identiques. Pour cette raison, preuve doit être faite de l'efficacité de l'équipement de HPLC/UPLC -spectrophotométrie avant que celui-ci ne soit utilisé pour quantifier le formazan des extraits tissulaires, en remplissant les critères d'acceptabilité pour un ensemble de paramètres normalisés de qualification inspirés des paramètres décrits dans les recommandations à l'industrie de la *Food and Drug Administration* des États-Unis sur la validation des méthodes de bio-analyse (38) (39). Ces paramètres fondamentaux et leurs critères d'acceptation sont fournis à l'appendice 4. Une fois que les critères d'acceptabilité définis à l'appendice 4 ont été remplis, l'équipement de HPLC/UPLC-spectrophotométrie est considéré comme ayant fait la preuve de son efficacité et prêt pour les mesures du formazan dans les conditions expérimentales décrites dans la présente méthode d'essai.

Critères d'acceptabilité

32. Pour chaque méthode d'essai recourant à des modèles d'épiderme humain reconstitué valides, les tissus traités par le témoin négatif présentent une DO rendant compte de la qualité des tissus qui respecte les plages d'acceptabilité du tableau 2 et qui ne doit pas être inférieure aux limites historiques. Les résultats obtenus pour les tissus traités par le témoin positif, c'est-à-dire l'acide acétique glacial ou l'hydroxyde de potassium 8N, doivent montrer leur capacité à réagir à un produit chimique corrosif dans les conditions du modèle d'essai (voir appendice 2). La variabilité entre les réplicats de tissus pour les produits chimiques d'essai et/ou les produits chimiques témoins doit se situer dans la plage acceptable pour chaque modèle validé d'épiderme humain reconstitué (voir appendice 2) (par exemple la différence de viabilité entre les deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 30 %). Si le témoin négatif ou positif inclus dans une épreuve sort de la plage d'acceptabilité, l'épreuve est considérée comme non qualifiée et doit être répétée. Si la variabilité des produits chimiques d'essai sort de la plage des valeurs admissibles, l'essai doit être répété.

Interprétation des résultats et modèle prédictif

33. Les valeurs de DO obtenues pour chaque produit chimique d'essai doivent servir à calculer un pourcentage de viabilité par rapport au témoin négatif, dont la DO est fixée à 100 %. Dans le cas où la spectrophotométrie HPLC-UPLC est utilisée, le pourcentage de viabilité cellulaire est obtenu en calculant le pourcentage de MTT formazan au pic obtenu avec les tissus vivants traités par le produit chimique d'essai par rapport au pic de MTT formazan obtenu avec le témoin négatif testé en parallèle. Les valeurs seuils du pourcentage de viabilité cellulaire qui établissent la distinction entre les matières corrosives et les matières non corrosives (ou entre les différentes sous-catégories de substances corrosives) sont définies ci-dessous aux paragraphes 35 et 36 pour chacun des modèles d'essai inclus dans la présente méthode d'essai et doivent être utilisées pour interpréter les résultats.

34. Une seule expérience réalisée à l'aide d'au moins deux réplicats de tissus devrait suffire pour tester un produit chimique dont la classification obtenue est sans équivoque. En revanche, dans le cas de résultats ambigus, tels que des mesures non concordantes pour les différents réplicats, une deuxième épreuve peut être envisagée, voire une troisième en cas de résultats discordants entre les deux premières.

35. Le tableau 4 présente le modèle prédictif de la méthode d'essai de corrosion cutanée EpiSkin™ (9) (22) (34), en correspondance avec le système de classification du SGH de l'ONU/du règlement CLP:

▼M8

Table 4

Modèle prédictif d'EpiSkin™

Viabilité mesurée après différents temps d'exposition (t = 3, 60 et 240 minutes)	Prévision à considérer
< 35 % après 3 minutes d'exposition	**Produit chimique corrosif:** • Sous-catégorie facultative 1A (*)
≥ 35 % après 3 minutes d'exposition **ET** < 35 % après 60 minutes d'exposition **OU** ≥ 35 % après 60 minutes d'exposition **ET** < 35 % après 240 minutes d'exposition	**Produit chimique corrosif:** • Combinaison des sous-catégories facultatives 1B et 1C
≥ 35 % après 240 minutes d'exposition	**Produit chimique non-corrosif**

(*) D'après les données produites pour évaluer l'utilité des modèles d'essai sur épiderme humain reconstitué à des fins de sous-catégorisation, environ 22 % des résultats du modèle d'essai EpiSkin™ relevant de la sous-catégorie 1A pourraient en fait constituer des substances/mélanges de sous-catégories 1B ou 1C (surclassification) (voir appendice 3).

36. Le tableau 5 présente les modèles prédictifs des modèles d'essai de corrosion cutanée EpiDerm™ SCT (10) (23) (35), SkinEthic™ RHE (17) (18) (23) (36) et epiCS® (16) (23) (37), en correspondance avec le système de classification du SGH de l'ONU/du règlement CLP:

Tableau 5

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE et epiCS®

Viabilité mesurée après différents temps d'exposition (t = 3 et 60 minutes)	Prévision à considérer
ÉTAPE 1 pour EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE et epiCS®	
< 50 % après 3 minutes d'exposition	**Produit chimique corrosif**
≥ 50 % après 3 minutes d'exposition **ET** < 15 %après 60 minutes d'exposition	**Produit chimique corrosif**
≥ 50 % après 3 minutes d'exposition **ET** ≥ 15 % après 60 minutes d'exposition	**Produit chimique non corrosif**
ÉTAPE 2 pour EpiDerm™ SCT- pour les substances et mélanges identifiés comme corrosifs à l'étape 1	
< 25 % après 3 minutes d'exposition	Sous-catégorie optionnelle 1A*
≥ 25 % après 3 minutes d'exposition	Une combinaison des sous-catégories 1B-et-1C
ÉTAPE 2 pour SkinEthic™ RHE pour les substances et mélanges identifiés comme corrosifs à l'étape 1corrosifs à l'étape 1	
< 18 % après 3 minutes d'exposition	Sous-catégorie optionnelle 1A*

▼M8

Viabilité mesurée après différents temps d'exposition (t = 3 et 60 minutes)	Prévision à considérer
ÉTAPE 1 pour EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE et epiCS®	
≥ 18 % après 3 minutes d'exposition	Une combinaison des sous-catégories 1B-et-1C
ÉTAPE 2 pour epiCS® pour les substances et mélanges identifiés comme corrosifs à l'étape 1	
< 15 % après 3 minutes d'exposition	Sous-catégorie optionnelle 1A*
≥ 15 % après 3 minutes d'exposition	Une combinaison des sous-catégories 1B-et-1C

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

37. Pour chaque essai, il convient de présenter, sous forme de tableau, les résultats obtenus pour chaque réplicat de tissu (par exemple les valeurs de DO et le pourcentage de viabilité cellulaire calculé pour chaque produit chimique d'essai, ainsi que la classification correspondante), y compris les données obtenues, le cas échéant, en répétant les expériences. En outre, les moyennes et les fourchettes de viabilité ainsi que les coefficients de variation entre les réplicats de tissus pour chaque essai doivent être consignés. Les interactions observées avec le réactif MTT pour les réducteurs directs du MTT et les produits chimiques d'essai colorés seront signalées pour chaque produit chimique d'essai.

Rapport d'essai

38. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Produits chimiques d'essai et produits chimiques témoins:

— Substance mono-constituant: Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent;

— Substance multi-constituants, UVCB ou mélange: Caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;

— Apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;

— Source et numéro de lot si disponible;

— Traitement du produit chimique d'essai ou du témoin avant la conduite de l'essai, s'il y a lieu (par exemple chauffage, broyage);

— Stabilité du produit chimique d'essai, date de péremption, ou date de vérification analytique si disponible;

— Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Modèle d'épiderme humain reconstitué et protocole utilisés; justification de ce choix (le cas échéant)

Conditions de l'essai:

— modèle d'épiderme humain reconstitué utilisé (y compris numéro de lot);

▼**M8**

— informations d'étalonnage de l'appareil de mesure (par exemple spectrophotomètre), longueur d'onde et passe-bande (s'il y a lieu) utilisés pour quantifier le MTT formazan, et la plage de linéarité de cet appareil de mesure;

— description de la méthode utilisée pour quantifier le MTT formazan;

— description des spécifications du système de spectrophotométrie HPLC/UPLC, s'il y a lieu;

— informations complètes sur le modèle spécifique d'épiderme humain reconstitué utilisé, et notamment sur ses performances, à savoir (liste non limitative):

i) viabilité;

ii) fonction de barrière;

iii) morphologie;

iv) reproductibilité et capacité prédictive;

v) contrôles de qualité (CQ) du modèle;

— références des données historiques du modèle utilisé, à savoir (liste non limitative) l'acceptabilité des données de contrôle de qualité au regard des données historiques du lot;

— démonstration de la compétence à exécuter la méthode d'essai, avant une utilisation régulière, au moyen des substances d'épreuve de compétence.

Protocole de l'essai:

— description détaillée des procédures appliquées, y compris les procédures de lavage utilisées après la période d'exposition;

— doses de produit chimique d'essai et de produit chimique témoin;

— durée de la ou des périodes d'exposition et température(s) d'exposition;

— indication des témoins utilisés pour les agents réducteurs directs du MTT et/ou les produits chimiques colorés, s'il y a lieu;

— nombre de réplicats de tissus utilisés par produit chimique d'essai et témoin (contrôle positif, témoin négatif et, le cas échéant, réduction non spécifique du MTT et coloration non spécifique, témoin vivant non spécifique (T_{vivant} NS), témoin mort non spécifique (T_{mort} NS)), par temps d'exposition;

— description des critères de décision/du modèle prédictif appliqués en fonction du modèle d'épiderme humain reconstitué utilisé;

— description de toute modificatin apportée au protocole d'essai (y compris aux procédures de lavage).

Critères d'acceptabilité de l'épreuve et de l'essai:

— valeur moyenne des témoins positifs et négatifs et plage d'acceptabilité par rapports aux données historiques;

— variabilité acceptable entre les réplicats de tissus pour les témoins positifs et négatifs;

▼**M8**

— variabilité acceptable entre les réplicats de tissus pour le produit chimique d'essai.

Résultats:

— présentation des résultats sous forme de tableau, pour chaque produit chimique d'essai et substance de témoin, chaque période d'exposition, chaque épreuve et chaque mesure de réplicat, y compris la densité optique ou le pic de MTT formazan, le pourcentage de viabilité cellulaire, le pourcentage moyen de viabilité cellulaire, les diff'rences entre les réplicats , l'erreur standard et/ou le coefficient de variation s'il y a lieu;

— S'il y a lieu, les résultats des témoins utilisés pour les agents réducteurs directs du MTT et/ou les produits chimiques d'essai colorants, y compris la densité optique ou le pic de MTT formazan, % MTT NS, % Tvivant NS, %Tmort NS, les différences entre les réplicats de tissus, l'erreur standard et/ou le coefficient de variation s'il y a lieu, et le pourcentage final corrigé de viabilité cellulaire;

— Résultats obtenus pour le ou les produits chimiques d'essai et le ou les produits chimiques témoins au regard des critères d'acceptabilité de l'épreuve et de l'essai définis;

— description de tous autres effets observés;

— classification obtenue compte tenu du modèle prédictif/des critères de décision utilisés.

Discussion des résultats

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

(1) Nations Unies (ONU). (2013). Système Général Harmonisé de Classification et d'Etiquetage des Produits Chimiques (SGH) des Nations Unies, Cinquième Edition Révisée, ONU New York et Genève. Disponibleàl'adresse: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) Chapitre B.4 de la présente annexe, Effet irritant/corrosif aigu sur la peau.

(3) Chapitre B.40 de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: essai de résistance électrique transcutanée (RET).

(4) Chapitre B.65 de la présente annexe, Méthode d'essai *in vitro* sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée.

(5) Chapitre B.46 de la présente annexe, Irritation cutanée *in vitro:* essai sur épiderme humain reconstitué.

(6) OCDE (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (N° 203) Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop *6.ATLA* 23:219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol.In Vitro* 12:471-482.

▼**M8**

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhutter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for SkinCorrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicol.in Vitro 12:483-524.

(10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.

(11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23:129-147.

(12) ICCVAM. (Comité de Coordination Interagences sur la Validation des Méthodes Alternatives) (1997), Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, États-Unis.

(13) ICCVAM (Comité de Coordination Interagences sur la Validation des Méthodes Alternatives). (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, États-Unis.

(14) CE-CEVMA. (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Publié par le Comité Consultatif Scientifique du CEVMA (ESAC10), 3 avril 1998.

(15) CE-CEVMA. (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Publié par le Comité Consultatif Scientifique du CEVMA (ESAC14), 21 mars 2000.

(16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol.In Vitro* 19: 925-929.

(17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann,H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., and Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol.In Vitro* 20: 547-559.

(18) Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 cm^2 Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379-1385.

(19) CE-CEVMA. (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Publié par le Comité Consultatif Scientifique du CEVMA (ESAC25), (17 novembre 2006).

(20) CE-CEVMA. (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an In-Vitro Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Publié par le Comité Consultatif Scientifique du CEVMA (ESAC30), (12 juin 2009).

▼**M8**

(21) OCDE (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 190). Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(22) Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28:131-145.

(23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055-2080.

(24) OCDE (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organisation de coopération et de développement économiques, Paris

(25) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(26) Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62:393-403.

(27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.

(28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro*. In: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier A.,. Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133-140.

(29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol.in Vitro* 8:889 - 891.

(30) Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. Inter. J. Pharmaceu. 203:211 - 225.

(31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310-319.

(32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163-171.

(33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF and Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8*:*747-756.

(34) EpiSkin™ SOP (December 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.

(35) EpiDerm™ SOP (February 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.

▼**M8**

(36) SkinEthic™ RHE SOP (January 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.

(37) EpiCS® SOP (January 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.

(38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., and McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: 741-761.

(39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (May 2001). Disponible à l'adresse: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

▼**M8**

Appendice 1

DÉFINITIONS

Précision: degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa pertinence. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de «concordance » pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (25).

Viabilité cellulaire: paramètre mesurant l'activité totale d'une population cellulaire, par exemple la capacité des déshydrogénases mitochondriales cellulaires à réduire le colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium], qui, selon l'effet mesuré et le protocole utilisé pour l'essai, est en corrélation avec le nombre total et/ou la vitalité des cellules vivantes.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Concordance: mesure de performance pour les méthodes d'essai produisant des résultats catégoriels. Elle constitue un des aspects de la pertinence. Ce terme est parfois utilisé indifféremment à la place de «précision », et se définit comme la proportion de tous les produits chimiques d'essai qui ont été correctement classés comme positifs ou négatifs. La concordance dépend étroitement de la prévalence des résultats positifs dans les types de substances mises à l'essai (25).

TE_{50}: valeur pouvant être estimée en déterminant le temps d'exposition nécessaire pour réduire la viabilité cellulaire de 50 % après application de la substance marqueur à une concentration fixe spécifiée. Voir également CI_{50}.

SGH de l'ONU [Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies]: système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans le but de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (1)

HPLC: Chromatographie Liquide Haute Performance.

IATA: Approches Intégrées d'Essai et d'Evaluation.

CI_{50}: valeur pouvant être estimée en déterminant la concentration d'une substance marqueur qui réduit la viabilité des tissus de 50 % (CI_{50}) après un temps d'exposition déterminé. Voir également TE_{50}.

Dose infinie: quantité de substance d'essai appliquée sur la peau qui dépasse la quantité requise pour recouvrir entièrement et uniformément la surface de l'épiderme.

Mélange: mélange ou solution composée de deux substances ou plus qui ne réagissent pas entre elles.

▼**M8**

Substance mono-constituant: une substance, définie par sa composition quantitiative, dans laquelle un des constituants principaux est présent à hauteur d'au moins 80 % (m/v).

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue tetrazolium bromide.

Substance multi-constituant: une substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant figure à une concentration supérieure à 10 % (m/v) et inférieure à 80 % (m/v). Une substance multi-constituant est le résultat d'un processus de fabrication. La différence entre un mélange et une substance multi-constituant est que le mélange est obtenu en mélangeant deux substances ou plus sans que celles-ci réagissent entre elles. Une substance multi-constituant est le résultat d'une réaction chimique.

NC: Non corrosif.

Témoin T_{mort} NS: témoin de couleur non-spécifique dans les tissus morts.

Témoin T_{vivant} NS: témoin de couleur non-spécifique dans les tissus vivants.

MTT NS: réduction non-spécifique du MTT.

DO: densité optique

Témoin positif: réplicat contenant tous les éléments du dispositif d'essai, traité au moyen d'un produit chimique connu pour induire une réponse positive. Afin de s'assurer que la variabilité des réponses du témoin positif peut être évaluée dans le temps, l'intensité de la réponse positive ne doit pas être excessive.

Normes de performance: normes, fondées sur une méthode d'essai validée, permettant d'évaluer la comparabilité d'une méthode d'essai proposée, structurellement et fonctionnellement similaire. Elles comprennent: (i) les éléments essentiels de la méthode d'essai, (ii) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi ceux utilisés pour démontrer les performances acceptables de la méthode d'essai validée, et (iii) les niveaux de fiabilité et de précision similaires à ceux obtenus avec la méthode d'essai validée, que la méthode d'essai proposée doit présenter lorsqu'on l'évalue à l'aide des produits chimiques de référence de la liste minimale (25).

Pertinence: description de la relation entre la méthode d'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité à des fins spécifiques. Elle définit le degré auquel l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (25).

Précision: degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa pertinence. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de «concordance » pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (25).

Épreuve: consiste à tester une ou plusieurs substances d'essai parallèlement à un témoin négatif et à un témoin positif.

▼**M8**

Sensibilité: proportion de l'ensemble des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par la méthode d'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriels, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (25).

Corrosion cutanée *in vivo*: survenue de lésions irréversibles de la peau. En l'occurrence, il s'agit de nécrose visible, à travers l'épiderme et jusque dans le derme, suite à l'application d'une substance d'essai pendant une durée allant jusqu'à quatre heures. Les réactions corrosives se traduisent généralement par des ulcères, des saignements, des croûtes sanguinolentes et, à la fin de la période d'observation, soit à 14 jours, par une décoloration due au blanchissement de la peau, des zones complètes d'alopécie, et des cicatrices. Un examen histopathologique peut être envisagé pour évaluer les lésions sujettes à questionnement.

Sensibilité: proportion de l'ensemble des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par la méthode d'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriels, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (25).

Substance: un élément chimique et ses composés à l'état naturel ou obtenus par un processus de fabrication, y compris tout additif nécessaire pour préserver sa stabilité et toute impureté résultant du processus mis en œuvre, à l'exclusion de tout solvant pouvant être séparé de la substance sans affecter sa stabilité ni modifier sa composition.

UPLC: Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance.

UVCB: substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes et matières biologiques.

▼M8

Appendice 2

PRINCIPAUX ÉLÉMENTS DES MODÈLES D'ESSAI SUR ÉPIDERME HUMAIN RECONSTITUÉ VALIDÉS POUR LES ESSAIS DE CORROSION CUTANÉE

Éléments du modèle d'essai	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Surface du modèle	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Nombre de réplicats de tissus	Au moins 2 par temps d'exposition	2-3 par temps d'exposition	Au moins 2 par temps d'exposition	Au moins 2 par temps d'exposition
Doses de traitement et application	Liquides et matières visqueuses: 50 µl ± 3 µl (131.6 µl/cm^2) Solides: 20 ± 2 mg (52.6 mg/cm^2) + 100 µl ± 5µl de solution NaCl (9 g/l) Cires/matières collantes: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) avec tulle de nylon	Liquides: 50 µl (79.4 µl/cm^2) avec ou sans tulle de nylon *Compatibilité pré-essai de la substance d'essai avec le tulle de nylon* Semi-solides: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Solides: 25 µl de H_2O (ou plus si nécessaire) + 25 mg (39.7 mg/cm^2) Cires: disque plat d'environ 8 mm de diamètre placé par-dessus le tissu humidifié avec 15 µl de H_2O	Liquides et matières visqueuses: 40 µl ± 3 µl (80 µl/cm^2) avec tulle de nylon *Compatibilité pré-essai de la substance d'essai avec le tulle de nylon* Solides: 20 µl ± 2 µl de H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Cires /matières collantes: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) avec tulle de nylon	Liquides: 50 µ, (83,3 µl/cm^2) avec tulle de nylon *Compatibilité pré-essai de la substance d'essai avec le tulle de nylon* Semi-solides: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Solides: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl de H_2O (ou plus si nécessaire) Cires: disque plat d'environ 8 mm de diamètre placé par-dessus le tissu humidifié avec 15 µl de H_2O
Pré-vérification de la réduction directe du MTT	50 µl (liquides) ou 20 mg (solides)+ 2 ml de MTT 0,3 mg/ml de solution pendant 180 ± 5 min à 37°C, sous CO_2 5 %, HR 95 % → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des témoins adaptés sur tissus tués dans l'eau	50 µl (liquides) ou 25 mg (solides) + 1 ml de MTT 1 mg/ml de solution pendant 60 min à 37°C, sous CO_2 5 %, HR 95 % → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des témoins adaptés sur tissus tués par congélation	40 µl (liquides) ou 20 mg (solides) + 1 ml de MTT 1 mg/ml de solution pendant 180± 15 min à 37°C, sous CO_2 5 %, HR 95 % → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des témoins adaptés sur tissus tués par congélation	50 µl (liquides) ou 25 mg (solides) + 1 ml de MTT 1 mg/ml de solution pendant 60 min à 37°C, sous CO_2 5 %, HR 95 % → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des témoins adaptés sur tissus tués par congélation

▼M8

Éléments du modèle d'essai	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Pré-vérification des interférences de couleur	10 µl (liquides) ou 10 mg (solides) + 90 µl de H_2O mélangés pendant 15 min à TA → si la solution se colore, il convient de recourir à des témoins adaptés sur tissus vivants	50 µl (liquides) ou 25 mg (solides) + 300 µl de H_2O pendant 60 min à 37°C, sous CO_2 5 %, HR 95 % → si la solution se colore, il convient de recourir à des témoins adaptés sur tissus vivants	40 µl (liquides) ou 20 mg (solides) + 300 µl de H_2O mélangés pendant 60 min à TA → si la substance d'essai se colore, il convient de recourir à des témoins adaptés sur tissus vivants	50 µl (liquides) ou 25 mg (solides) + 300 µl de H_2O pendant 60 min à 37°C, sous CO_2 5 %, HR 95 % → si la solution se colore, il convient de recourir à des témoins adaptés sur tissus vivants
Temps d'exposition et température	3 min, 60 min (± 5 min) et 240 min (± 10 min) en armoire ventilée à température ambiante (TA, 18-28°C)	3 min à TA, et 60 min à 37°C, sous CO_2 5 %, HR 95 %	3 min à TA, et 60 min à 37°C, sous CO_2 5 %, HR 95 %	3 min à TA, et 60 min à 37°C, sous CO_2 5 %, HR 95 %
Rinçage	25 ml 1x SSTP (2 ml/nettoyage)	20 fois à jet doux constant de 1x SSTP	20 fois à jet doux constant de 1x SSTP	20 fois à jet doux constant de 1x SSTP
Témoin négatif	50 µl de solution NaCl (9 g/l) Testé pour chaque temps d'exposition	50 µl de H_2O Testé pour chaque temps d'exposition	40 µl de H_2O Testé pour chaque temps d'exposition	50 µl de H_2O Testé pour chaque temps d'exposition
Témoin positif	50 µl d'acide acétique glacial Testé pendant 4 heures seulement	50 µl d'hydroxyde de potassium 8N Testé pour chaque temps d'exposition	40 µl d'hydroxyde de potassium 8N Testé pendant 1 heure seulement	50 µl d'hydroxyde de potassium 8N Testé pour chaque temps d'exposition
Solution MTT	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Durée et température d'incubation du MTT	180 min (± 15 min) à 37°C, sous CO_2 5 %, HR 95 %	180 min à 37°C, sous CO_2 5 %, HR 95 %	180 min (± 15 min) à 37°C, sous CO_2 5 %, HR 95 %	180 min à 37°C, sous CO_2 5 %, HR 95 %

▼M8

Éléments du modèle d'essai	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Solvant d'extraction	500 µl d'isopropanol acidifié (0,04 de N HCl dans de l'isopropanol) (tissu isolé entièrement immergé)	2 ml d'isopropanol (extraction depuis le dessus et le dessous de l'insert)	1,5 ml d'isopropanol (extraction depuis le dessus et le dessous de l'insert)	2 ml d'isopropanol (extraction depuis le dessus et le dessous de l'insert)
Durée et température d'extraction	Pendant une nuit à TA, à l'abri de la lumière	Pendant une nuit sans agiter à TA ou pendant 120 min en agitant (~ 120 rpm) à TA	Pendant une nuit sans agiter à TA ou pendant 120 min en agitant (~ 120 rpm) à TA	Pendant une nuit sans agiter à TA ou pendant 120 min en agitant (~ 120 pm) à TA
Lecture de la DO	570 nm (545-595 nm) sans filtre de référence	570 nm (ou 540 nm) sans filtre de référence	570 nm (540- 600 nm) sans filtre de référence	540-570 nm sans filtre de référence
Contrôle de qualité des tissus	18 heures de traitement par SDS 1,0 mg/ml ≤ CI_{50} ≤ 3,0 mg/ml	Traitement par Triton X-100 à 1 % 4,08 heures ≤ TE_{50} ≤ 8,7 heures	Traitement par Triton X-100 à 1 % 4,0 heures ≤ TE_{50} ≤ 10,0 heures	Traitement par Triton X-100 à 1 % 2,0 heures ≤ TE_{50} ≤ 7,0 heures
Critères d'acceptabilité	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif (NaCl) doit être ≥ 0,6 et ≤ 1,5 pour chaque temps d'exposition 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 4 heures au témoin positif (acide acétique glacial), exprimée en % du témoin négatif, doit être ≤ 20 % 3. Dans la plage de viabilité entre 20 % et 100 % et pour les DO ≥ 0,3, la différence de viabilité entre les deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 30 %	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif (H_2O) doit être ≥ 0,8 et ≤ 2,8 pour chaque temps d'exposition 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 1 heure au témoin positif (hydroxyde de potassium 8N), exprimée en % du témoin négatif, doit être < 15 % 3. Dans la plage de viabilité entre 20 % et 100 %, le coefficient de variation (CV) entre les réplicats de tissus doit être ≤ 30 %	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif (H_2O) doit être ≥ 0,8 et ≤ 3,0 pour chaque temps d'exposition 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 1 heure (et 4 heures le cas échéant) au témoin positif (hydroxyde de potassium 8N), exprimée en % du témoin négatif, doit être < 15 % 3. Dans la plage de viabilité entre 20 % et 100 % et pour les DO ≥ 0,3, la différence de viabilité entre les deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 30 %	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif (H_2O) doit être ≥ 0,8 et ≤ 2,8 pour chaque temps d'exposition 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 1 heure au témoin positif (hydroxyde de potassium 8N), exprimée en % du témoin négatif, doit être < 20 % 3. Dans la plage de viabilité entre 20 % et 100 % et pour les DO≥ 0,3, la différence de viabilité entre les deux réplicats ne doit pas dépasser 30 %.

▼**M8**

Appendice 3

PERFORMANCE DES MODÈLES D'ESSAI EN MATIÈRE DE SOUS-CATÉGORISATION

Le tableau ci-dessous illustre les performances des quatre modèles d'essai, déterminées à partir d'un ensemble de 80 produits chimiques testés par les quatre développeurs. Les calculs ont été réalisés par le Secrétariat de l'OCDE, puis revus et approuvés par un sous-groupe d'experts (21) (23).

Les modèles d'essai EpiSkin™, EpiDerm™ , SkinEthic™ et epiCS® sont à même de permettre une sous-catégorisation (1A vs 1B et 1C vs substances non corrosives)

Performances, taux de surclassification, taux de sous-classification et précision (valeur prédictive) des quatre modèles d'essai à partir d'un ensemble de 80 produits chimiques, tous testés lors de 2 ou 3 épreuves pour chaque modèle d'essai:

STATISTIQUES SUR LES PRÉDICTIONS OBTENUES SUR L'ENSEMBLE COMPLET DE PRODUITS CHIMIQUES

(n = 80 produits chimiques, testés lors de 2 épreuves indépendantes pour epiCS® ou 3 épreuves indépendantes pour EpiDerm™, EpiSkin™, SkinEthic™RHE, respectivement, soit 159 (*) ou 240 classifications)

	EpiDerm™	EpiSkin™	SkinEthic™	epiCS®
Surclassifications:				
Produits chimiques de cat. 1BC surclassés en 1A	29,0 %	21,50 %	31,2 %	32,8%
Produits chimiques non corrosifs surclassés en 1BC	23,4 %	20,7 %	27,0 %	28,4%
Produits chimiques non corrosifs surclassés en 1A	2,7 %	0,00 %	0,0 %	0,00%
Produits chimiques non corrosifs surclassés comme corrosifs	26,1 %	20,7 %	27,0 %	28,4%
Taux global de surclassification (toutes catégories)	**23,3 %**	**17,9 %**	**24,5 %**	**25,8%**
Sous-classifications:				
Produits chimiques de cat. 1A sous-classés en 1BC	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5%
Produits chimiques de cat. 1A sous-classés comme non corrosifs	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00%
Produits chimiques de cat. 1BC sous-classés comme non corrosifs	0,00 %	2,2 %	7,5 %	6,6%
Taux global de sous-classification (toutes catégories)	**2,5 %**	**3,3 %**	**5,4%**	**4,4%**
Classifications correctes:				
Correctement classés en 1A	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5%
Correctement classés en 1BC	71,0 %	76,3 %	61,3 %	60,7%
Correctement classés comme non corrosifs	73,9 %	79,3 %	73,0 %	71,6%
Précision (Valeur prédictive)	**74,2 %**	**78,8 %**	**70,0 %**	**69,8%**

(*) un produit chimique n'a pu être testé qu'une seule fois asur epiCS® car indisponible (23)

▼**M8**

Appendice 4

Paramètres fondamentaux et critères d'acceptabilité pour la qualification d'un système de spectrophotométrie HPLC/UPL pour quantifier le formazan des extraits tissulaires.

Paramètre	Protocole dérivé d'un document d'orientation de la *Food and Drug Aministration (37) (38)*	Critère d'acceptabilité
Sélectivité	Analyse de l'isopropanol, blanc vivant (isopropanol extrait de tissu vivant non traité), blanc mort (isopropanl extrait de tissue mort non traité)	$Surface_{interférence}$ ≤20 % $surface_{LBQ1}$ ([1])
Précision	Contrôles de qualité (càd. Formazan à 1,6 µg /ml, 16 µg /ml et 160 µg /ml) dans l'isopropanol (n=5)	CV≤15 % ou ≤20 % pour la LBQ
Exactitude	Contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=5)	% Dev ≤15 % ou ≤20 % pour la LBQ
Effet matriciel	Contrôles de qualité dans le blanc vivant	85 % ≤ Effet matriciel % ≤115 %
Report	Analyse de l'isopropanol après un standard de LHQ^2 ([2])	$Surface_{interférence}$ ≤20 % $surface_{LBQ}$
Reproductibilité (dans la journée)	3 courbes indépendantes de calibration (sur la base de dilutions consécutives à 1/3 de formazan dans l'isopropoanol, en partant de la LBQ, càd. 200 µg /ml); contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=5) Etalonage	Courbes: %Dev≤15 % ou ≤20 % pour LBQ Qualité Témoins: %Dev≤15 % et CV≤15 % Reproductibilité
(d'un jour à l'autre)	Jour 1: une courbe de calibration et contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3) Jour 2: une courbe de calibration et contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3) Jour 3: une courbe de calibration et contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3)	
Stabilité à court terme du formazan dans un extrait tissulaire	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=3) analysés le jour de la préparation et après 24h de stockage à température ambiante.	% Dev ≤15 %
Stabilité à long terme du formazan dans un extrait tissulaire	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=3) analysés le jour de la préparation et plusieurs jours de stockage à des températures spécifiques (p.ex. 4°C, -20°C, -80°C).	% Dev ≤15 %

([1]) LBQ: Limite Basse de Quantification, définie par une couverture de 1-2 % de viabilité tissulaire, c'est-à-dire 0,8 µg/ml.
([2]) LHQ: Limite Haute de Quantification, définie pour être au moins deux fois supérieure à la détection maximale attendue de concentration de formazan dans les extraits d'isopropanol des témoins négatifs, c'est-à-dire 200 µg/ml.

▼B

B.41. **ESSAI DE PHOTOTOXICITE IN VITRO 3T3 NRU**

1. **MÉTHODE**

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 432 (2004) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La phototoxicité est définie comme un effet toxique dû à l'application d'une substance sur le corps, qui est soit déclenché ou accentué (et visible à des niveaux de dose faibles) après une exposition ultérieure à la lumière, soit provoqué par l'irradiation de la peau après administration d'une substance par voie systémique.

Le test de phototoxicité in vitro 3T3 NRU permet de déterminer le potentiel phototoxique d'une substance d'essai induit par l'excitation du produit chimique après exposition à la lumière. Cet essai évalue la réduction relative de la viabilité des cellules exposées au produit chimique, en présence ou en l'absence de lumière. Les substances identifiées par cet essai sont susceptibles d'être phototoxiques in vivo après administration systémique et diffusion dans la peau, ou après application topique.

Des effets phototoxiques ont été signalés pour de nombreux types de produits chimiques (1) (2) (3) (4). Le point commun entre ces derniers est leur capacité à absorber l'énergie lumineuse dans la plage de la lumière solaire. D'après la première loi de photochimie (loi de Grotthaus-Draper), la photoréaction nécessite l'absorption d'un nombre suffisant de quanta de lumière. Aussi convient-il, avant d'envisager un essai biologique, de déterminer le spectre d'absorption UV/lumière visible du produit chimique à tester suivant la ligne directrice 101 de l'OCDE. Si le coefficient d'extinction/d'absorption molaire est inférieur à 10 litres × mol^{-1} × cm^{-1}, le produit chimique n'a pas de potentiel photoréactif et il est inutile de le soumettre à l'essai de phototoxicité in vitro 3T3 NRU ou à tout autre test biologique visant à détecter des effets photochimiques indésirables (1) (5). Voir également l'annexe 1.

Les résultats de l'essai de phototoxicité in vitro 3T3 NRU récemment évalué (6) (7) (8) (9) ont été comparés aux effets de phototoxicité aiguë in vivo chez les animaux et chez les humains, et l'essai s'est révélé fiable pour la prévision de ces effets. L'essai n'est pas conçu pour prévoir d'autres effets nocifs susceptibles de résulter de l'action combinée d'un produit chimique et de la lumière, tels que la photogénotoxicité, la photo-allergie, et la photocancérogénicité, et il ne permet pas non plus d'évaluer le pouvoir phototoxique. Par ailleurs, cet essai n'est pas conçu pour prendre en compte les mécanismes indirects de la phototoxicité, les effets des métabolites de la substance d'essai, ou les effets des mélanges.

Alors que l'utilisation de systèmes d'activation métabolique est nécessaire en règle générale pour tous les tests in vitro de prédiction du potentiel génotoxique ou cancérogène, dans le cas de la phototoxicologie, on ne dispose jusqu'à présent que de rares exemples de produits chimiques qui nécessitent une transformation métabolique pour agir comme une phototoxine in vivo ou in vitro. Par conséquent, il ne paraît pas utile ni scientifiquement fondé de réaliser le présent essai en présence d'un système d'activation métabolique.

▼B

1.2. DÉFINITIONS

Irradiance: intensité du rayonnement ultraviolet (UV) ou visible incident sur une surface, mesurée en W/m^2 ou en mW/cm^2.

Dose de lumière: quantité (= intensité × temps) de rayonnement ultraviolet (UV) ou visible incident sur une surface, exprimée en Joules (= W × s) par unité de surface, par exemple, J/m^2 ou J/cm^2.

Bandes de longueurs d'ondes de la lumière UV: les désignations recommandées par la CIE (Commission internationale de l'éclairage) sont: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) et UVC (100-280 nm). D'autres désignations sont également utilisées; la limite entre UVB et UVA est souvent placée à 320 nm, et les UVA peuvent être subdivisés en UV-A1 et UV-A2 avec une limite à environ 340 nm.

Viabilité cellulaire: paramètre mesurant l'activité totale d'une population cellulaire (par exemple, absorption du colorant vital rouge neutre dans les lysosomes cellulaires), qui, en fonction de l'effet mesuré et du type de test utilisé, correspond au nombre total et/ou à la vitalité des cellules.

Viabilité cellulaire relative: viabilité cellulaire exprimée par rapport aux témoins négatifs (solvant) qui ont été prélevés tout ou long de la procédure (soit +Irr soit -Irr), mais non traités par un produit chimique.

PIF (Photo Irritation Factor — Facteur de photo-irritation): facteur obtenu en comparant deux concentrations cytotoxiques efficaces (CE_{50}) de la substance chimique d'essai, obtenues en absence (-Irr) ou en présence (+Irr) d'une irradiation non cytotoxique par un rayonnement UVA/visible.

CE_{50}: concentration de la substance chimique d'essai à laquelle la viabilité cellulaire est réduite de 50 pour cent.

MPE (Mean Photo Effect — Photo-effet moyen): mesure dérivée d'une analyse mathématique du tracé de deux courbes concentration-effet obtenues avec (+Irr) ou sans (-Irr) irradiation non cytotoxique par un rayonnement UVA/visible.

Phototoxicité: réaction toxique aiguë apparaissant après une première exposition de la peau à certains produits chimiques et exposition subséquente à la lumière, ou déclenchée par l'irradiation de la peau après administration systémique d'un produit chimique.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Le test de phototoxicité in vitro 3T3 NRU repose sur la comparaison de la cytotoxicité d'une substance chimique avec et sans exposition à une dose non cytotoxique de lumière solaire simulée. Dans cet essai, la cytotoxicité est exprimée comme la diminution, en fonction de la concentration, de la fixation du colorant vital rouge neutre [Neutral Red — NR] 24 heures après traitement par le produit chimique mis à l'essai et irradiation (10). Le rouge neutre est un colorant cationique faible qui pénètre facilement dans les membranes cellulaires par non-diffusion, et s'accumule au niveau intracellulaire dans les lysosomes. L'altération de la surface cellulaire de la membrane lysosomale sensible entraîne une fragilité lysosomale et d'autres modifications qui deviennent graduellement irréversibles. Ces modifications induites par l'action de xénobiotiques entraînent une diminution de la fixation du rouge neutre, sur la base de laquelle on peut distinguer les cellules vivantes, des cellules mortes ou abîmées.

▼B

Des cellules Balb/c 3T3 sont maintenues en culture pendant 24 heures jusqu'à formation de monocouches. Pour chaque substance chimique à tester, deux plaques à 96 puits sont alors préincubées pendant 1 heure avec 8 concentrations distinctes de la substance chimique. Ensuite, l'une des deux plaques est exposée à la dose d'irradiation non cytotoxique la plus élevée, tandis que l'autre plaque est maintenue à l'obscurité. Dans les deux plaques, le milieu de traitement est ensuite remplacé par un milieu de culture et, après une nouvelle période d'incubation de 24 heures, la viabilité cellulaire est déterminée par le test de fixation du rouge neutre (Neutral Red Uptake — NRU). La viabilité cellulaire relative, exprimée sous forme d'un pourcentage des témoins de solvant non traités, est calculée pour chaque concentration d'essai. Afin de prévoir le potentiel phototoxique, les réponses aux concentrations obtenues en présence et en absence d'irradiation sont comparées, généralement au niveau CE_{50}, c'est-à-dire la concentration inhibant la viabilité cellulaire de 50 pour cent par rapport aux témoins non traités.

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1 **Préparations**

1.4.1.1 *Cellules*

Une lignée permanente de cellules de fibroblaste de souris, Balb/c 3T3, clone 31, provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginie, Etats-Unis), ou de l'ECACC (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire, Royaume-Uni) a été utilisée dans l'étude de validation et il est donc recommandé que les cellules proviennent d'un dépositaire de cellules bien qualifié. D'autres cellules ou lignées cellulaires peuvent aussi donner de bons résultats avec le même protocole d'essai si les conditions de culture sont adaptées aux besoins spécifiques des cellules. Il convient toutefois d'en démontrer l'équivalence.

Les cellules doivent être régulièrement contrôlées pour vérifier l'absence de contamination par des mycoplasmes, et ne doivent être utilisées que si aucun n'est trouvé (11).

Il importe de contrôler régulièrement la sensibilité aux UV des cellules Balb/c 3T3 selon la procédure de contrôle qualité décrite dans la présente méthode. Dans la mesure où la sensibilité aux UVA des cellules peut augmenter avec le nombre de passages, il convient d'utiliser des cellules Balb/c 3T3 ayant subi le moins de passages possibles, de préférence moins de 100 (voir point 1.4.2.2.2 et annexe 2).

1.4.1.2. *Milieux et conditions de culture*

Des milieux de culture et des conditions d'incubation appropriés doivent être utilisés pour le passage systématique des cellules et pendant la procédure d'essai. Par exemple, pour les cellules Balb/c 3T3, le milieu de culture est du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) enrichi avec 10 pour cent de sérum de veau nouveau-né, de glutamine (4mM), de pénicilline (100 UI) et de streptomycine (100 µg/ml), et incubé à 37 °C en atmosphère humidifiée, avec une teneur en CO_2 de 5 à 7,5 pour cent selon le tampon (voir point 1.4.1.4, second paragraphe). Il est particulièrement important que les conditions de culture cellulaire permettent de maintenir la durée du cycle cellulaire dans les limites normales historiques des cellules ou de la lignée cellulaire utilisées.

1.4.1.3 *Préparation des cultures*

Des cellules provenant de cultures mères congelées sont mises en culture à une densité appropriée dans le milieu de culture, et sont repiquées au moins une fois avant d'être utilisées pour le test de phototoxicité in vitro 3T3 NRU.

▼B

Pour le test de phototoxicité, le milieu de culture est ensemencé avec une densité de cellules telle que les cultures n'arrivent pas à confluence avant la fin de l'essai, c'est-à-dire au moment où la viabilité cellulaire est déterminée, 48 heures après la mise en culture des cellules. Pour les cellules Balb/c 3T3 cultivées sur des plaques à 96 puits, la densité cellulaire recommandée est de 1×10^4 cellules par puits.

Pour chaque substance chimique testée, les cellules sont mises en culture de manière identique sur deux plaques à 96 puits distinctes, qui sont utilisées parallèlement pendant toute la procédure d'essai, dans les mêmes conditions de culture, sauf pendant la période où l'une des plaques est irradiée (+ Irr) et l'autre maintenue à l'obscurité (- Irr).

1.4.1.4 *Préparation de la substance d'essai*

Les substances chimiques de l'essai doivent être fraîchement préparées, juste avant utilisation, à moins que les données de stabilité ne démontrent qu'elles sont conservables. Il est recommandé de procéder à la manipulation des substances chimiques et au traitement initial des cellules dans des conditions d'éclairage permettant d'éviter la photoactivation ou la dégradation de la substance d'essai avant irradiation.

Les substances chimiques de l'essai doivent être dissoutes dans des solutions salines tamponnées, par exemple, solution saline équilibrée de Earl (Earl's Balanced Salt Solution — EBSS) ou d'autres solutions tamponnées physiologiquement équilibrées, exemptes de constituants protéiques qui absorbent la lumière (par exemple, indicateurs pH colorés et vitamines), afin d'éviter les interférences lors de l'irradiation. Sachant que, pendant l'irradiation, les cellules sont maintenues pendant 50 minutes environ en dehors de l'incubateur CO_2, des précautions doivent être prises pour éviter l'alcalinisation. Avec des solutions faiblement tamponnées, telles que l'EBSS, il convient alors d'incuber les cellules à 7,5 pour cent de CO_2. Si les cellules sont incubées à 5 pour de CO_2 seulement, un tampon plus fort doit être utilisé.

Les substances chimiques ayant une solubilité limitée dans l'eau doivent être dissoutes dans des solvants appropriés. Si un solvant est utilisé, il doit être présent à un volume constant dans toutes les cultures, c'est-à-dire dans les témoins négatifs (solvant) et dans toutes les concentrations de la substance chimique d'essai, et être en outre non cytotoxique à la concentration utilisée. Les concentrations de la substance chimique doivent être sélectionnées de façon à éviter les précipités ou les solutions troubles.

Les solvants recommandés sont le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'éthanol (EtOH). D'autres solvants de faible cytotoxicité peuvent convenir, mais leurs propriétés spécifiques doivent être évaluées avant utilisation, notamment les risques de réaction avec la substance chimique d'essai, l'atténuation de l'effet phototoxique, les propriétés de fixation des radicaux, et/ou la stabilité du produit chimique dans le solvant.

Si nécessaire, on peut recourir à un mélangeur Vortex et/ou à la sonication et/ou à un chauffage à des températures appropriées pour faciliter la solubilisation, à moins qu'une telle manipulation n'affecte la stabilité de la substance chimique.

▼B

1.4.1.5 *Conditions d'irradiation*

1.4.1.5.1 Source de lumière

Le choix d'une source de lumière et d'un filtrage appropriés est le facteur déterminant dans les essais de phototoxicité. Les domaines des UVA et de la lumière visible sont généralement associés à des réactions phototoxiques in vivo (3) (12), tandis que les UVB sont moins pertinents, mais très cytotoxiques, avec une cytotoxicité qui augmente d'un facteur 1 000 entre 313 et 280 nm (13). Parmi les critères présidant au choix de la source de lumière appropriée, il est essentiel que la source de lumière émette des longueurs d'onde absorbées par la substance chimique d'essai et que la dose de lumière (pouvant être obtenue dans un délai d'exposition raisonnable) soit suffisante pour détecter les substances photocytotoxiques connues. En outre, les longueurs d'onde et les doses employées ne doivent pas trop endommager le système d'essai, par exemple par l'émission de chaleur (domaine infrarouge).

La lumière solaire simulée par des simulateurs solaires est considérée comme la source optimale de lumière artificielle. La distribution du pouvoir d'irradiation du simulateur solaire filtré doit être proche de celle de la lumière du jour extérieure donnée dans le document (14). Des arcs au xénon ou des arcs aux halogénures de métal-mercure (dopé) peuvent être utilisés comme simulateurs solaires (15). Ces derniers ont l'avantage d'émettre moins de chaleur et d'être moins chers, mais ils reproduisent moins bien la lumière solaire que les simulateurs utilisant des arcs au xénon. Dans la mesure où tous les simulateurs solaires émettent d'importantes quantités d'UVB, ils doivent être équipés de filtres adéquats pour atténuer les longueurs d'onde UVB hautement cytotoxiques. Dans la mesure où les matériaux plastiques utilisés pour les cultures cellulaires contiennent des stabilisateurs UV, le spectre doit être mesuré à travers le même type de plaques à 96 puits que celui employé dans l'essai. Abstraction faite des mesures prises pour atténuer une part du spectre par filtration, ou des effets de filtre inévitables liés aux appareils, le spectre enregistré sous ces filtres ne doit pas dévier de la norme de lumière du jour extérieure (14). Les documents (8) (16) donnent un exemple de distribution de l'irradiance spectrale du simulateur solaire équipé de filtres qui a été utilisé dans l'étude de validation du test in vitro 3T3 NRU. Voir également la Figure 1 de l'annexe 2.

1.4.1.5.2. Dosimétrie

L'intensité de lumière (irradiance) doit être régulièrement contrôlée avant chaque essai de phototoxicité, à l'aide d'un radiomètre UV à large bande approprié. L'intensité doit être mesurée à travers le même type de plaques à 96 puits que celui employé dans l'essai. Le radiomètre UV doit avoir été étalonné par rapport à la source. Les performances du radiomètre UV doivent être contrôlées. À cet effet, on recommande l'utilisation d'un second radiomètre UV de référence, du même type et étalonné de la même façon. Dans l'idéal, à intervalles plus grands, il conviendrait d'utiliser un spectroradiomètre pour mesurer l'irradiance spectrale de la source de lumière filtrée et pour vérifier l'étalonnage du radiomètre UV à large bande.

Une dose de 5 J/cm^2 (dans la plage des UVA) est non cytotoxique pour les cellules Balb/c 3T3 et suffisamment puissante pour exciter les substances chimiques et déclencher des réactions phototoxiques (6) (17). Par exemple, pour obtenir 5 J/cm^2 dans un délai de 50 minutes, l'irradiance a été réglée à 1,7 mW/cm^2. Voir la Figure 2 de l'annexe 2. En cas d'utilisation d'une autre lignée cellulaire ou d'une source de lumière différente, il peut s'avérer nécessaire d'ajuster la dose d'irradiation en choisissant une dose qui ne soit pas nocive pour les cellules tout en étant suffisante pour exciter les phototoxines standard. La durée de l'exposition à la lumière se calcule de la façon suivante:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{irradiation dose } (J/cm^2) \times 1000}{\text{irradiance } (mW/cm^2) \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ Wsec})$$

1.4.2 **Conditions d'essai**

1.4.2.1 *Concentrations de la substance d'essai*

Les plages de concentrations du produit chimique testé en présence (+Irr) et en absence (-Irr) de lumière doivent être déterminées de manière adéquate lors d'expériences préalables. Il peut être utile d'évaluer la solubilité au début puis après un délai de 60 minutes (ou à la durée employée dans l'essai), dans la mesure où celle-ci peut varier avec le temps ou au cours de l'exposition. Pour éviter toute toxicité induite par des conditions de culture inappropriées ou des substances chimiques hautement acides ou alcalines, il faut que le pH des cultures cellulaires, auxquelles la substance d'essai a été ajoutée, soit dans une plage comprise entre 6,5 et 7,8.

La concentration la plus élevée de la substance d'essai doit être dans les conditions d'essai physiologiques, par exemple le stress pH ou osmotique doit être évité. Selon la substance d'essai, il peut s'avérer nécessaire d'envisager d'autres propriétés physico-chimiques comme facteurs limitant la concentration d'essai la plus élevée. Pour les substances relativement insolubles, mais non toxiques à des concentrations allant jusqu'au point de saturation, il y a lieu de procéder à des essais pour déterminer la concentration la plus élevée qui puisse être atteinte. De manière générale, il y a lieu d'éviter les effets de précipités de la substance chimique à toutes les concentrations d'essai. La concentration maximale d'une substance d'essai ne doit pas dépasser 1 000 μg/ml, et l'osmolarité ne doit pas dépasser 10 milliosmoles. Il convient d'utiliser une série de dilutions en progression géométrique comprenant 8 concentrations de la substance d'essai avec un facteur de dilution constant (voir point 2.1, second paragraphe).

Si les informations provenant d'expériences préalables établissent qu'une substance chimique n'est pas cytotoxique jusqu'à la concentration limite dans l'obscurité (-Irr), mais se révèle hautement cytotoxique exposée à la lumière (+Irr), les plages de concentrations à choisir pour l'expérience (+Irr) peuvent être différentes de celles utilisées pour l'expérience (-Irr), de façon à garantir une qualité adéquate des résultats.

1.4.2.2 *Contrôles/Témoins*

1.4.2.2.1. Sensibilité des cellules aux radiations, données historiques:

la sensibilité des cellules à la source lumineuse doit être régulièrement contrôlée (tous les cinq passages environ), par évaluation de leur viabilité après une exposition à des doses croissantes d'irradiation. Pour cette évaluation, plusieurs doses d'irradiation doivent être utilisées, y compris des niveaux significativement supérieurs à ceux de l'essai de phototoxicité 3T3 NRU. La méthode la plus simple pour quantifier ces doses consiste à mesurer les UV à la source. Les cellules sont mises en culture à la densité utilisée dans l'essai de phototoxicité in vitro 3T3 NRU. Elles sont irradiées le jour suivant, et la viabilité cellulaire est déterminée un jour plus tard à l'aide du test NRU. Il faut alors que la dose non cytotoxique la plus élevée (par exemple, 5 J/cm^2 [UVA] dans l'étude de validation) soit suffisante pour classer correctement les substances de référence (Tableau 1).

▼B

1.4.2.2.2. Sensibilité aux radiations, contrôle de l'essai en cours:

l'essai répond aux critères de qualité si les témoins de contrôle négatifs (solvant) irradiés ont une viabilité supérieure ou égale à 80 pour cent de celle des témoins de contrôle négatifs non irradiés.

1.4.2.2.3. Viabilité des témoins de solvant

la densité optique absolue (OD_{540} NRU), mesurée dans l'extrait NR des témoins de solvant indique si les 1×10^4 cellules mises en culture par puits se sont développées avec un temps de doublement normal pendant les deux jours de l'essai. Un essai répond aux critères d'acceptation si la densité optique moyenne OD_{540} NRU des témoins non traités est > 0,4 (c'est-à-dire approximativement vingt fois l'absorbance de fond du solvant).

1.4.2.2.4 Témoin positif:

Pour chaque essai de phototoxicité in vitro 3T3 NRU réalisé, un produit chimique phototoxique connu doit être testé concurremment. La chlorpromazine (CPZ) est recommandée. Dans le cas de la CPZ testée selon le protocole standard dans le test de phototoxicité in vitro 3T3 NRU, les critères d'acceptation suivants ont été définis: CPZ irradiée (+Irr): CE_{50} = 0,1 à 2,0 µg/ml; CPZ non irradiée (-Irr): CE_{50} = 7,0 à 90,0 µg/ml. Le facteur de photo-irritation (PIF) doit être > 6. Les données historiques du témoin positif doivent être suivies.

À la place de la CPZ, d'autres produits chimiques phototoxiques convenant à la classe chimique ou aux caractéristiques de solubilité de la substance chimique à tester, peuvent aussi être utilisés en tant que témoins positifs parallèles.

1.4.3 **Mode opératoire (6) (7) (8) (16) (17):**

1.4.3.1 *Premier jour:*

Verser 100 µl de milieu de culture dans les puits périphériques d'une plaque de microtitrage de culture tissulaire à 96 puits (= essais à blanc). Dans les puits restants, verser 100 µl d'une suspension cellulaire de 1×10^5 cellules/ml en milieu de culture, (= 1×10^4 cellules/puits). Préparer deux plaques pour chaque série des concentrations de la substance à tester, ainsi que pour les témoins négatifs (de solvant) et positifs.

Incuber les cellules pendant 24 heures (voir point 1.4.1.2) jusqu'à formation d'une monocouche semi-confluente. Cette période d'incubation permet la récupération et l'adhérence des cellules, et leur croissance exponentielle.

1.4.3.2 *Deuxième jour:*

Après incubation, décanter le milieu de culture pour le séparer des cellules et laver délicatement avec 150µl de la solution tamponnée utilisée pour l'incubation. Ajouter 100 µl de la solution tamponnée contenant la concentration appropriée de la substance chimique à tester, ou uniquement du solvant (témoin négatif). Appliquer 8 concentrations distinctes de la substance chimique à tester. Incuber les cellules avec la substance chimique à tester dans l'obscurité pendant 60 minutes (voir points 1.4.1.2 et 1.4.1.4, second paragraphe).

Sur les deux plaques préparées pour chaque série de concentrations, ainsi que pour les témoins, une plaque est sélectionnée, généralement au hasard, pour la détermination de la cytotoxicité (-Irr) (par exemple, la plaque témoin), et l'autre (la plaque de traitement) pour la détermination de la photocytotoxicité (+Irr).

▼B

Pour réaliser la partie (+Irr) de l'essai, irradier les cellules à température ambiante pendant 50 minutes environ à travers le couvercle de la plaque à 96 puits, à la dose maximale de radiations non cytotoxique (voir également annexe 2). Conserver les plaques identiques non irradiées (-Irr) à température ambiante dans une boîte obscure pendant 50 minutes (= durée de l'exposition à la lumière).

Décanter la solution d'essai et laver deux fois avec 150 µl de la solution tamponnée utilisée pour l'incubation, mais ne contenant pas la substance d'essai. Remplacer le tampon par le milieu de culture et incuber (voir le point 1.4.1.2) jusqu'au lendemain (18-22 heures).

1.4.3.3 *Troisième jour:*

1.4.3.3.1 Évaluation microscopique

Examiner les cellules au microscope à contraste de phase. Noter la croissance, la morphologie et l'intégrité de la monocouche. Les changements morphologiques et les effets sur la croissance cellulaire doivent être enregistrés.

1.4.3.3.2 Test de fixation du rouge neutre

Laver les cellules avec 150 µl de la solution tamponnée préchauffée. Éliminer la solution de lavage en tapotant légèrement. Ajouter 100 µl d'un rouge neutre (3-amino-7-diméthylamino-2-méthylphénazine chlorhydrate, numéro EINECS 209-035-8; numéro CAS 553-24-2; CI. 50040) à 50 µg/ml dans un milieu sans sérum (16) et incuber comme décrit au point 1.4.1.2., pendant 3 heures. Après incubation, éliminer le milieu NR et laver les cellules avec 150 µl du tampon. Décanter et évacuer complètement le tampon en excès par absorption ou centrifugation.

Ajouter exactement 150 µl de solution de désorption NR (solution fraîchement préparée de 49 parts d'eau + 50 parts d'éthanol + 1 part d'acide acétique).

Passer rapidement la plaque de microtitrage à l'agitateur pendant 10 minutes, jusqu'à ce que le NR soit extrait des cellules et forme une solution homogène.

Mesurer la densité optique de l'extrait de NR à 540 nm dans un spectrophotomètre en utilisant les essais à blanc comme référence. Sauvegarder les données dans un format de fichier électronique approprié en vue d'une analyse ultérieure.

2. RÉSULTATS

2.1. QUALITÉ ET QUANTITÉ DES DONNÉES

Les données d'essai doivent permettre une analyse significative des courbes concentration-effet obtenues avec et sans irradiation, et si possible de la concentration de la substance d'essai à laquelle la viabilité cellulaire est réduite de moitié (CE_{50}). Si on constate une cytotoxicité, il y a lieu d'ajuster à la fois la gamme des concentrations et l'intervalle entre chaque concentration, afin qu'il y ait concordance entre la courbe et les données expérimentales.

Pour les résultats clairement positifs ou clairement négatifs (voir point 2.3), l'expérience principale, étayée par une ou plusieurs expériences préliminaires de détermination des gammes de concentrations, est généralement suffisante.

▼B

Les tests qui donnent des résultats équivoques, limites ou incertains doivent être vérifiés par un essai supplémentaire (voir également point 2.4, second paragraphe). Si cet essai s'avère nécessaire, il peut être utile de faire varier les conditions expérimentales, et notamment la plage ou l'espacement des concentrations, le temps de préincubation, et le temps d'exposition à l'irradiation. Une réduction de cette durée d'exposition peut présenter un intérêt pour les produits chimiques instables dans l'eau.

2.2. ÉVALUATION DES RÉSULTATS

Pour procéder à l'évaluation des données, il peut être nécessaire de calculer un facteur de photo-irritation (PIF) ou un photo-effet moyen (MPE).

Pour le calcul des mesures de photocytotoxicité (voir ci-après), l'ensemble des valeurs discrètes de concentration-effet doit être déterminé par une courbe concentration-effet continue appropriée (modèle). On fait généralement concorder la courbe aux données en appliquant une méthode de régression non linéaire (18). Pour évaluer l'influence de la variabilité des données sur la courbe ajustée, il est recommandé d'employer une procédure de type «bootstrap».

On calcule un facteur de photo-irritation (PIF) à l'aide de la formule suivante:

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+Irr)}$$

S'il n'est pas possible de calculer une CE_{50} en présence ou en l'absence de lumière, il ne sera pas possible de déterminer un PIF pour la substance d'essai. Le photo-effet moyen (MPE) est une mesure basée sur une comparaison des courbes concentration-effet complètes (19). Il correspond à la moyenne pondérée d'un ensemble représentatif de valeurs du photo-effet:

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Le photo-effet PEc à une concentration C est défini comme le produit de la réponse-effet RE_C et de la dose-effet DE_C, soit $PE_C = RE_C \times DE_C$. La réponse-effet RE_C correspond à la différence entre les réponses observées en absence et en présence de lumière, soit $RE_C = R_C$ (-Irr) — R_C (+Irr). La dose-effet est donnée par la formule suivante

$$DE_c = \left|\frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1}\right|$$

où C* représente la concentration équivalence, c'est-à-dire la concentration à laquelle la réponse +Irr est équivalente à la réponse -Irr à la concentration C. S'il n'est pas possible de déterminer C* parce que les valeurs de la courbe +Irr sont systématiquement supérieures ou inférieures à RC (-Irr), la dose-effet est fixée à 1. Les facteurs de pondération w_1 sont donnés par la valeur la plus élevée, soit w_i = MAX {R_i (+Irr), R_i (-Irr)}. La grille de concentration C_i est choisie de façon à ce que le même nombre de points figure dans chaque intervalle de concentration défini par les valeurs de concentration utilisées dans l'expérience. Le calcul du MPE est limité par la valeur de concentration maximale à laquelle au moins une des deux courbes montre une valeur de réponse d'au moins 10 pour cent. Si cette concentration maximale est supérieure à la concentration la plus élevée utilisée dans l'expérience +Irr, la partie résiduelle de la courbe +Irr est ajustée à la valeur de réponse «0». La substance chimique est ensuite classée ou non comme étant phototoxique, selon que la valeur MPE est supérieure ou non à une valeur de seuil correctement choisie (MPE_C = 0,15).

▼B

Un logiciel de calcul du PIF et du MPE est disponible (20).

2.3. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Sur la base de l'étude de validation (8), une substance d'essai dont le PIF est < 2 ou le MPE < 0,1 ne présente «aucune phototoxicité». Un PIF > 2 et < 5 ou un MPE > 0,1 et < 0,15 indique une «phototoxicité probable» et un PIF > 5 ou un MPE > 0,15 indique une «phototoxicité».

Pour les laboratoires qui entreprennent cet essai pour la première fois, il est préconisé de procéder à un essai sur les substances de référence données dans le Tableau 1, avant d'entreprendre l'évaluation phototoxique de substances d'essai. Les valeurs PIF ou MPE doivent être proches des valeurs données dans le tableau 1.

Tableau 1

Nom de la substance chimique	Nº EINECS	Nº CAS	PIF	MPE	Pic d'absorption	Solvant (1)
Amiodarone chlorhydrate	243-293-2	[19774-82-4]	>3,25	0,27 - 0,54	242 nm 300 nm (épaulement)	éthanol
Chlorpromazine chlorhydrate	200-701-3	[69-09-0]	>14,4	0,33 - 0,63	309 nm	éthanol
Norfloxacine	274-614-4	[70458-96-7]	>71,6	0,34 - 0,90	316 nm	acétonitrile
Anthracène	204-371-1	[120-12-7]	>18,5	0,19 - 0,81	356 nm	acétonitrile
Protoporphyrine IX, disodium	256-815-9	[50865-01-5]	>45,3	0,54 - 0,74	402 nm	éthanol
L — Histidine		[7006-35-1]	pas de PIF	0,05 - 0,10	211 nm	eau
Hexachlorophene	200-733-8	[70-30-4]	1,1 - 1,7	0,00 - 0,05	299 nm 317nm (épaulement)	éthanol
Sulfate de sodium et de dodécyle	205-788-1	[151-21-3]	1,0 - 1,9	0,00 - 0,05	pas d'absorption	eau

(1) Solvant utilisé pour mesurer l'absorption.

2.4. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Si des effets phototoxiques ne sont observés qu'à la concentration d'essai maximale (en particulier pour les substances d'essai solubles dans l'eau), d'autres investigations peuvent s'avérer nécessaires pour évaluer les risques. Il peut s'agir notamment d'étudier l'absorption cutanées et l'accumulation du produit chimique dans la peau, et/ou de soumettre le produit à un autre type d'essai, en recourant par exemple à des essais in vitro sur peau humaine ou animale, ou sur modèle de peau.

▼B

En revanche, si aucune toxicité n'a été mise en évidence (+Irr et -Irr) et si la solubilité faible du produit dans l'eau a limité les concentrations d'essai, il faut peut-être s'interroger sur l'adéquation du système d'essai pour la substance à tester, et envisager un essai de confirmation avec un autre modèle.

3. **RAPPORT**

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir au minimum les informations suivantes:

Substance d'essai:

— données d'identification, nom générique commun et numéros IUPAC et CAS si connus

— nature physique et pureté

— propriétés physico-chimiques importantes pour la réalisation de l'étude

— spectre d'absorption UV/lumière visible

— stabilité et photostabilité si connues

Solvant:

— justification du choix du solvant

— solubilité de la substance d'essai dans le solvant

— pourcentage de solvant présent dans le milieu de traitement

Cellules:

— type et provenance des cellules

— absence de mycoplasmes

— nombre de passages cellulaires, si connu

— sensibilité des cellules aux radiations, déterminée avec l'appareil d'irradiation utilisé dans l'essai de phototoxicité in vitro 3T3 NRU.

Conditions expérimentales (1) *incubation avant et après traitement:*

— type et composition du milieu de culture

— conditions d'incubation (concentration de CO_2, température, humidité)

— durée de l'incubation (avant traitement et après traitement)

Conditions expérimentales (2) *traitement par la substance chimique:*

— justification du choix des concentrations de substance d'essai utilisées, en présence et en absence de rayonnement

— en cas de solubilité limitée du produit chimique et d'absence de cytotoxicité, justification de la concentration maximale utilisée

— type et composition du milieu de traitement (solution saline tamponnée)

— durée du traitement chimique.

Conditions expérimentales (3) *Irradiation:*

— justification de la source de lumière utilisée

▼B

— fabricant et type de source de lumière et de radiomètre

— caractéristiques d'irradiance spectrale de la source de lumière

— caractéristiques de transmission/absorption du (des) filtre(s) utilisé(s)

— caractéristiques du radiomètre et modalités d'étalonnage

— distance entre la source de lumière et le système d'essai

— irradiance UVA à cette distance, exprimée en mW/cm^2

— durée de l'exposition UV/lumière visible

— dose d'UVA (irradiance × temps), exprimée en J/cm^2

— température appliquée aux cultures cellulaires durant l'irradiation et aux cultures cellulaires maintenues concurremment dans l'obscurité.

Conditions expérimentales (4) *test NRU:*

— composition du milieu de traitement NR

— durée de l'incubation dans NR

— conditions d'incubation (concentration de CO^2, température, humidité)

— d'extraction du NR (agent d'extraction, durée)

— longueur d'ondes utilisée pour la lecture spectrophotométrique de la densité optique du NR

— seconde longueur d'ondes (référence), le cas échéant

— contenu de l'échantillon destiné à l'essai à blanc du spectrophotomètre, le cas échéant.

Résultats:

— viabilité cellulaire obtenue pour chaque concentration de la substance d'essai, exprimée en pour cent de la viabilité moyenne des témoins de solvant

— courbes de concentration-effet (concentration de la substance chimique — viabilité cellulaire relative) obtenues dans les expériences +Irr et -Irr parallèles

— analyse des courbes concentration-effet: si possible, calcul/détermination des CE_{50} (+Irr) et CE_{50} (-Irr)

— comparaison des deux courbes concentration-effet obtenues en présence et en l'absence de rayonnement, soit par le calcul du facteur de photo-irritation (PIF), soit par le calcul du photo-effet moyen (MPE)

— critères d'acceptation de l'essai, témoin négatif (solvant) simultané:

— viabilité absolue (densité optique de l'extrait de NR) des cellules irradiées et des cellules non irradiées

— données historiques sur les témoins négatif et de solvant, moyennes et écarts types

— critères d'acceptation de l'essai, témoin positif simultané:

▼B

— CE_{50} (+Irr) et CE_{50} (-Irr) et PIF/MPE du produit chimique témoin positif

— données historiques sur le produit chimique témoin positif: CE_{50} (+Irr) et CE_{50} (-Irr) et PIF/MPE moyennes et écarts types.

Discussion des résultats

Conclusions

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) Lovell W.W. (1993). A scheme for in vitro screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7, p. 95-102.

(2) Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In «Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry» Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam, p. XI-XXXV.

(3) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). In vitro phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, p. 314-348.

(4) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In «The science of Photobiology» Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p. 79-110.

(5) OECD (1997). Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No7 «Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water» Environment Directorate, OECD, Paris.

(6) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8, p. 793-796.

(7) Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an in vitro test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, p. 7-8.

(8) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA In vitro phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. In Vitro 12, p. 305-327.

(9) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30^{th}-31^{th} October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15^{th} March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

(10) Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24 p. 119-124.

(11) Hay, R.J. (1988). The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, p. 225-237.

▼B

(12) Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In «Dermatotoxicology», edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p. 515-530.

(13) Tyrrell, R.M., Pidoux, M. (1987). Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, p. 1825-1829.

(14) ISO 10977. (1993). Photography — Processed photographic colour films and paper prints — Methods for measuring image stability.

(15) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No 90, Vienna, 1993, ISBN 3900734275

(16) ZEBET/ECVAM/COLIPA — Standard Operating Procedure: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998, p. 18.

(17) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC,* in the in vitro 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, p. 679-708.

(18) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, p. 127-138.

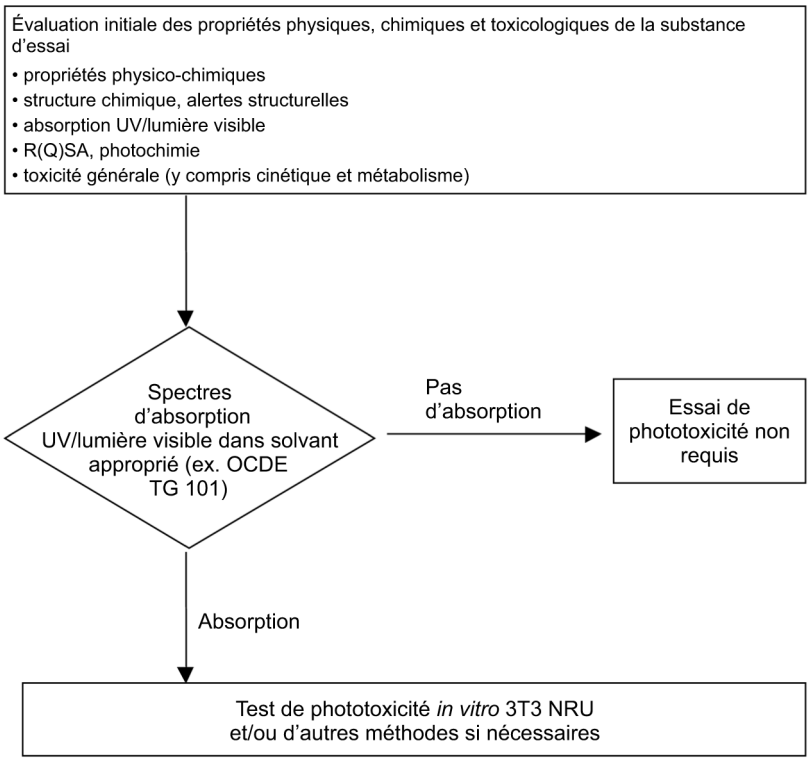
(19) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of in vitro phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the in vivo phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, p. 445-462.

(20) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

▼B

ANNEXE 1

Rôle de l'essai de phototoxicité 3T3 NRU dans une approche séquentielle des essais de phototoxicité des substances chimiques

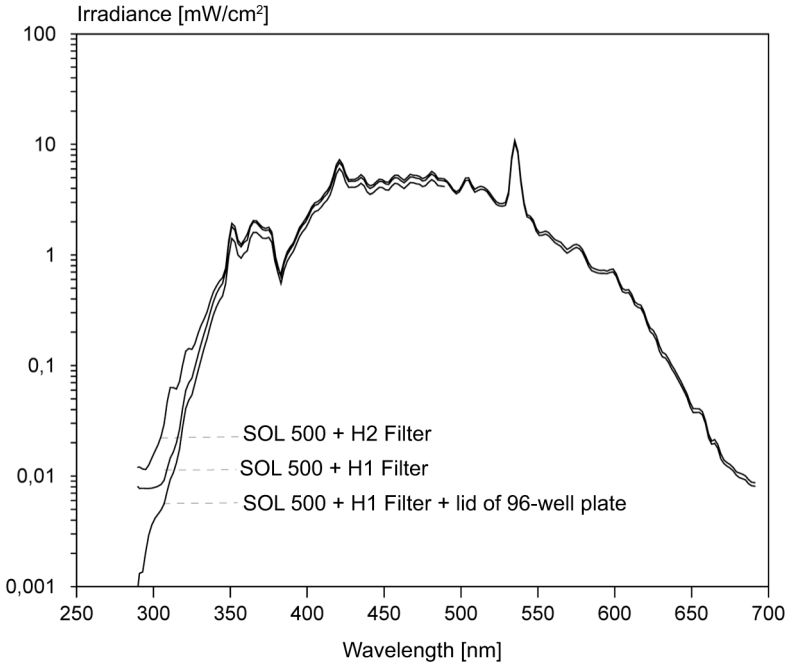


▼B

ANNEXE 2

Figure 1

Distribution spectrale énergétique d'un simulateur solaire équipé de filtres



(voir point 1.4.1.5, second paragraphe)

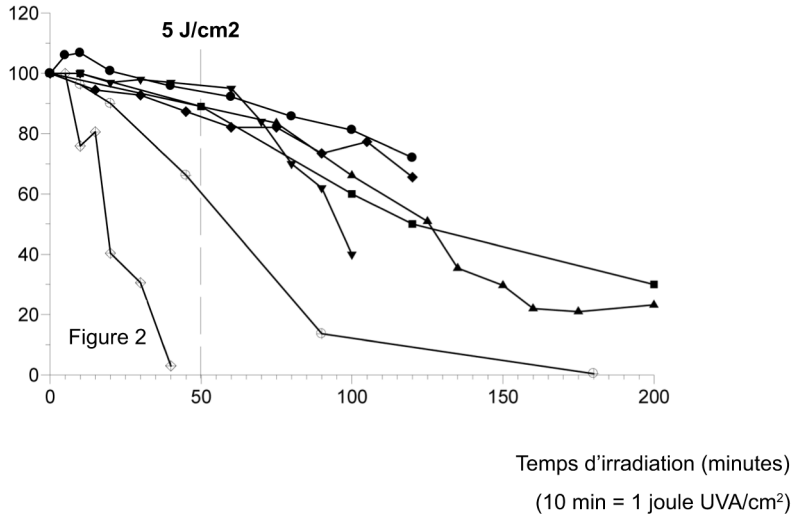
La figure 1 donne un exemple de distribution acceptable de l'énergie spectrale d'un simulateur solaire équipé de filtres. Elle correspond à la source aux halogénures de métaux dopés utilisée dans l'essai de validation du test 3T3 NRU (6) (8) (17). Cette figure fait apparaître l'effet des deux filtres distincts, ainsi que l'effet de filtration de la plaque à 96 puits. Le filtre H2 est utilisé uniquement avec les systèmes d'essai qui peuvent supporter une quantité plus importante d'UVB (essai sur modèle de peau et essai de photo-hémolyse des globules rouges). Dans l'essai 3T3 NRU, le filtre H1 a été utilisé. La figure montre que l'effet de filtration supplémentaire de la plaque est principalement observé dans la plage des UVB, laissant néanmoins suffisamment d'UVB dans le spectre d'irradiation pour exciter les substances chimiques qui absorbent généralement la lumière dans la plage des UVB, telles que l'amiodarone (voir le tableau 1).

▼B

Figure 2

Sensibilité des cellules Balb/c 3T3 à l'irradiation (mesurée dans la plage des UVA)

Viabilité cellulaire (% de fixation du rouge neutre des témoins dans l'obscurité)



Temps d'irradiation (minutes) (10 min = 1 joule UVA/cm^2)

(voir point 1.4.1.5.2, second paragraphe, et points 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Sensibilité des cellules Balb/c 3T3 à l'irradiation avec le simulateur solaire utilisé dans l'essai de validation du test de phototoxicité 3T3 NRU, mesurée dans la plage des UVA. La figure montre les résultats obtenus dans sept laboratoires différents au cours de l'étude de prévalidation (1). Les deux courbes avec des symboles transparents ont été obtenues avec des cellules âgées (nombre de passages élevés) qu'il a fallu remplacer par de nouvelles cellules, tandis que les courbes aux symboles pleins sont associées à des cellules montrant une tolérance acceptable à l'irradiation.

C'est à partir de ces données qu'on a dérivé la dose maximale d'irradiation non cytotoxique de 5 J/cm^2 (ligne discontinue verticale). La ligne de pointillés horizontale montre en outre l'effet maximal d'irradiation acceptable (point 1.4.2.2).

▼M3

B.42. SENSIBILISATION CUTANÉE: ESSAI DE STIMULATION LOCALE DES GANGLIONS LYMPHATIQUES

INTRODUCTION

1. Les lignes directrices (LD) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques et les méthodes d'essai de l'Union européenne qui sont fondées sur celles-ci sont régulièrement révisées à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences réglementaires et de considérations relatives au bien-être des animaux. La méthode d'essai initiale visant à déterminer la sensibilisation cutanée chez la souris, c'est-à-dire l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL; LD 429 de l'OCDE, chapitre B.42 de la présente annexe), a été adoptée antérieurement (1). Les détails de la validation de l'ELGL et une synthèse des travaux qui y sont associés ont été publiés (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). La révision de l'ELGL s'appuie sur l'évaluation de l'expérience acquise et des données scientifiques (12). Il s'agit de la deuxième méthode d'essai permettant d'évaluer le pouvoir de sensibilisation cutanée de substances chimiques (substances et mélanges) chez les animaux. L'autre méthode d'essai (LD 406 de l'OCDE, chapitre B.6 de la présente annexe) fait appel à des essais sur cobayes, notamment l'essai de maximisation sur le cobaye et l'essai de Buehler (13). L'ELGL présente un avantage par rapport au chapitre B.6 et à la LD 406 de l'OCDE (13) en termes de bien-être des animaux. Cette mise à jour de la méthode d'essai sur l'ELGL comprend une série de normes de performance (appendice 1) pouvant servir à évaluer l'état de validation des méthodes d'essai modifiées et/ou nouvelles, dont le fonctionnement et le mécanisme sont similaires à ceux de l'ELGL, conformément aux principes énoncés dans le document d'orientation n° 34 de l'OCDE (14).

2. L'ELGL s'intéresse à la phase d'induction de la sensibilisation cutanée et livre des données quantitatives permettant d'évaluer la relation dose-effet. Il convient de noter que les sensibilisants légers/modérés recommandés comme témoins positifs (TP) pour les essais sur cobayes (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (13) conviennent également à l'ELGL (6) (8) (15). La présente méthode d'essai décrit également une approche simplifiée de l'ELGL (ELGLs) optionnelle, qui pourrait nécessiter jusqu'à 40 % d'animaux en moins (16) (17) (18). Cet essai simplifié pourrait être utilisé en cas de besoin réglementaire de confirmer les prévisions négatives concernant le pouvoir de sensibilisation cutanée, à condition de rester en conformité avec toutes les autres dispositions du protocole ELGL décrit dans la présente méthode d'essai. La prédiction d'un résultat négatif s'appuie sur toutes les informations disponibles, comme cela est décrit au paragraphe 4. Tout recours à l'approche ELGL simplifiée est préalablement justifié, avec le détail des raisons scientifiques étayant ce choix. Si, en dépit des prévisions, l'ELGL simplifié donne une réponse positive ou équivoque, des essais supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires pour interpréter ou clarifier le résultat. L'ELGLs ne convient pas pour identifier les substances d'essai sensibilisantes pour la peau lorsque des données sur la relation dose-effet sont nécessaires, comme pour la sous-catégorisation conformément au règlement (CE) n° 1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, et à la classification du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques de l'Organisation des Nations-Unies.

DÉFINITIONS

3. Les définitions utilisées sont données à l'appendice 2.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

4. L'ELGL constitue une méthode de remplacement pour identifier les substances et mélanges chimiques susceptibles d'exercer une action sensibilisante sur la peau. Cela n'implique pas que l'ELGL doive systématiquement remplacer les essais sur cobayes (B.6, LD 406 de l'OCDE) (14) mais plutôt qu'il s'agit d'un outil d'une qualité égale pouvant se substituer à ces essais, et dont les résultats positifs ou négatifs n'ont généralement plus besoin de confirmation supplémentaire. Avant de procéder à l'essai, le laboratoire rassemble toutes les informations disponibles sur la substance d'essai, à

▼M3

savoir son identité et sa structure chimiques, ses propriétés physico-chimiques, les résultats de tous les autres essais de toxicité in vitro et in vivo, et les données toxicologiques sur des analogues de structure. Ces informations servent à déterminer s'il est pertinent d'appliquer la méthode ELGL avec la substance considérée, étant donné l'incompatibilité de certains types de substances chimiques avec l'ELGL (voir paragraphe 5), et aident à choisir les doses appropriées.

5. La méthode ELGL, mise en œuvre in vivo, ne met donc pas un terme à l'utilisation d'animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact. Elle est néanmoins susceptible de réduire le nombre d'animaux requis à ces fins. En outre, l'ELGL propose un raffinement important (réduction du stress et de la douleur) de l'utilisation des animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact. L'ELGL se fonde sur les réactions immunologiques induites par les produits chimiques pendant la phase d'induction de la sensibilisation. Contrairement aux essais sur cobayes (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (13), l'ELGL ne s'appuie pas sur le déclenchement de réactions d'hypersensibilité cutanée par une exposition de déclenchement. De plus, l'ELGL ne requiert aucun adjuvant, contrairement à l'essai de maximisation sur le cobaye (13). C'est pourquoi l'ELGL réduit la souffrance et le stress chez les animaux. Malgré les avantages de l'ELGL par rapport au chapitre B.6 et à la LD 406 de l'OCDE, certaines limites peuvent imposer de privilégier l'utilisation du chapitre B.6 ou de la LD 406 de l'OCDE (13) [par exemple, résultats faussement négatifs avec certains métaux, résultats faussement positifs avec certaines substances irritantes pour la peau, en particulier des tensioactifs (19) (20), ou solubilité de la substance d'essai]. De surcroît, certaines substances chimiques ou familles de substances comprenant des groupements fonctionnels dont il est démontré qu'ils peuvent être des facteurs de confusion (21) peuvent aussi imposer le recours aux essais avec cobayes (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (13). Par ailleurs, en examinant la base de données de validation, limitée et essentiellement constituée de formulations de pesticides, on observe que l'ELGL donne plus de résultats positifs que l'essai sur cobayes pour ces types de substances (22). Concernant les formulations, il est cependant envisageable de tester des substances similaires aux effets connus en tant que substances étalons, afin de prouver que l'ELGL est efficace (voir paragraphe 16). Dans ces limites, l'ELGL est applicable à toute substance qui ne présente pas de propriétés susceptibles d'affecter la précision de l'essai.

PRINCIPE DE L'ESSAI

6. L'ELGL repose sur le principe que les sensibilisants induisent une prolifération de lymphocytes dans les ganglions lymphatiques drainant le site de l'application de la substance d'essai. Cette prolifération est proportionnelle à la dose appliquée et à la puissance de l'allergène, et permet d'obtenir facilement une mesure quantitative de la sensibilisation. Pour mesurer la prolifération, on compare la prolifération moyenne de chaque groupe d'essai à la prolifération moyenne du groupe témoin traité avec le véhicule (TV). On calcule le quotient de la prolifération moyenne dans chaque groupe traité sur celle du TV, pour obtenir l'indice de stimulation (IS); si cette valeur est supérieure ou égale à 3, il est justifié de classer la substance d'essai comme substance ayant un pouvoir de sensibilisation cutanée. Les procédures décrites ici mesurent la prolifération cellulaire dans les ganglions lymphatiques auriculaires de drainage à l'aide d'un marquage radioactif in vivo. Il est toutefois possible de faire appel à d'autres paramètres pour évaluer le nombre de cellules en prolifération, à condition de respecter strictement les normes de performance (appendice 1).

▼M3

DESCRIPTION DE L'ESSAI

Choix des espèces animales

7. L'espèce retenue pour cet essai est la souris. On utilise de jeunes femelles adultes, nullipares et non gravides, de souche CBA/Ca ou CBA/J. Au début de l'étude, les animaux sont âgés de 8 à 12 semaines et affichent une variation de poids minime entre eux n'excédant pas 20 % du poids moyen. Il est aussi possible d'utiliser d'autres souches ainsi que des mâles s'il existe suffisamment d'informations démontrant l'absence de différences significatives entre les souches et/ou les sexes en ce qui concerne la réaction à l'ELGL.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

8. Les souris sont hébergées par groupes (23), sauf si une raison scientifique pertinente exige un encagement individuel. La température de l'animalerie est maintenue à 22 °C ± 3 °C. L'humidité relative atteint au moins 30 % et de préférence ne dépasse pas 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit maintenue aux alentours de 50-60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les animaux peuvent être alimentés par un régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété.

Préparation des animaux

9. Les animaux sont sélectionnés au hasard, marqués pour permettre leur identification individuelle (mais jamais sur l'oreille) et gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours avant le commencement du traitement afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire. Avant de commencer le traitement, on examine tous les animaux pour vérifier qu'ils ne présentent pas de lésions cutanées observables.

Préparation des solutions d'essai

10. Les substances et mélanges chimiques solides sont dissouts ou dispersés dans des solvants/véhicules puis dilués, s'il y a lieu, avant d'être appliqués sur l'oreille des souris. Les substances et mélanges chimiques liquides peuvent être appliqués purs ou préalablement dilués. Les substances et mélanges chimiques insolubles, comme ceux que l'on rencontre généralement dans les dispositifs médicaux, sont soumis à une extraction forcée à l'aide d'un solvant approprié pour faire ressortir tous les composants extractibles qu'il est possible d'évaluer, avant l'application sur l'oreille des souris. Les substances d'essai sont préparées chaque jour à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'elles peuvent être stockées.

Contrôle de la fiabilité

11. Les témoins positifs (TP) servent à démontrer le bon fonctionnement de l'essai en répondant de manière adéquate et reproductible à une substance d'essai sensibilisante pour lequel l'ordre de grandeur des effets est bien connu. Il est recommandé d'inclure un TP concurrent puisqu'il démontre la capacité du laboratoire à mener chaque essai correctement, et permet d'évaluer la comparabilité et la reproductibilité intra- et interlaboratoires. Par ailleurs, dans la mesure où certaines autorités réglementaires exigent un TP dans chaque essai, les expérimentateurs sont encouragés à consulter les autorités concernées avant de mener l'ELGL. De même, le recours systématique à un TP concurrent est recommandé pour éviter d'avoir à réaliser des essais supplémentaires sur animaux, ce qui est parfois exigé lorsqu'un laboratoire se réfère à un TP testé périodiquement (voir paragraphe 12). Le TP doit réagir positivement à l'ELGL pour un niveau d'exposition supposé accroître l'indice de stimulation de plus. Le TP doit réagir positivement à l'ELGL pour un niveau d'exposition supposé accroître l'indice de stimulation de plus de 3 points par rapport au groupe témoin négatif (TN). La dose de TP est choisie de manière à ne pas entraîner d'irritation cutanée excessive ou de toxicité systémique, l'induction devant être reproductible sans

▼M3

être exagérée (un IS > 20 est considéré comme excessif, par exemple). Les substances utilisées en priorité comme TP sont l'hexyl cinnamaldéhyde à 25 % (N° CAS [Chemical Abstracts Service] 101-86-0) dans un mélange acétone/huile d'olive (4:1, v/v), ainsi que le mercaptobenzothiazole (N° CAS 149-30-4) à 5 % dans le N,N-diméthylformamide (voir appendice 1, tableau 1). Dans certains cas, d'autres substances d'essai répondant aux critères susmentionnés pourront être employées comme témoins positifs, à condition que ce choix soit correctement justifié.

12. Si l'inclusion d'un groupe TP concurrent demeure recommandée, dans certaines circonstances des essais périodiques (c'est-à-dire à intervalles ≤ 6 mois) du TP peuvent convenir pour des laboratoires menant régulièrement (c'est-à-dire au moins une fois par mois) des ELGL et disposant d'une base de données de référence montrant que le laboratoire est apte à obtenir des résultats précis et reproductibles avec les TP. La capacité d'un laboratoire à mener l'ELGL est efficacement démontrée quand le TP déclenche des résultats positifs cohérents à l'issue d'un minimum de 10 essais indépendants étalés sur une période raisonnable (c'est-à-dire inférieure à un an).

13. Il convient d'inclure un groupe TP concurrent à chaque fois que le protocole de l'ELGL est modifié (par exemple si des modifications interviennent au niveau du personnel qualifié, des composés et/ou réactifs utilisés pour la méthode d'essai, de l'équipement mis en œuvre ou de la source d'animaux d'expérience), et ces changements sont documentés dans les rapports de laboratoire. Il faudra tenir compte de l'impact de ces changements sur la validité des données de la base historique pour décider de l'opportunité d'établir une nouvelle base de données afin d'évaluer la cohérence des résultats relatifs au TP.

14. Les investigateurs gardent à l'esprit que faire une étude de TP périodiquement plutôt que systématiquement comme concurrent pèse sur la précision et l'acceptabilité des résultats négatifs obtenus à l'issue d'un essai sans TP concurrent réalisé dans l'intervalle entre chaque essai périodique du TP. Par exemple, si un essai périodique du TP donne un faux négatif, l'ensemble des résultats négatifs obtenus avec la substance d'essai depuis le dernier essai de TP valable pourront être remis en question. Il faut donc soigneusement considérer les implications de telles retombées avant de décider si les TP seront des concurrents systématiques ou s'ils feront l'objet d'essais périodiques. Par ailleurs, le nombre d'animaux du groupe TP concurrent est réduit si cela se justifie du point de vue scientifique et si le laboratoire démontre, en s'appuyant sur ses propres données historiques, que l'on peut utiliser moins de souris (12).

15. Quoique le témoin positif doive être testé dans un véhicule déclenchant un effet constant (par exemple acétone/huile d'olive (4:1, v/v)], certaines situations réglementaires nécessitent aussi l'essai d'un véhicule moins courant (mélange cliniquement ou chimiquement pertinent) (24). Si le TP concurrent est testé avec un véhicule différent de celui de la substance d'essai, il convient de mettre en place un essai témoin indépendant pour le véhicule du TP.

16. Lorsqu'il s'agit d'évaluer des substances d'essai appartenant à une classe chimique particulière ou donnant des résultats situés dans une certaine fourchette, des substances étalons peuvent s'avérer utiles pour montrer que la méthode d'essai fonctionne correctement et permet de détecter le pouvoir de sensibilisation cutanée de ces types de substances. Les substances étalons présentent les propriétés suivantes:

— similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie des substances d'essai à tester,

— caractéristiques physiques et chimiques connues,

— données connues provenant de l'ELGL,

— données connues provenant d'autres modèles animaux et/ou de l'être humain.

▼M3

MODE OPÉRATOIRE

Nombre d'animaux et doses

17. On utilise au moins quatre animaux par groupe de dose, et un minimum de trois concentrations de la substance d'essai, ainsi qu'un groupe témoin négatif concurrent ne recevant que le véhicule de cette substance d'essai et un témoin positif (concurrent ou récent selon les pratiques du laboratoire, voir paragraphes 11-14). On peut envisager de tester différentes doses du témoin positif, en particulier quand celui-ci ne fait l'objet que d'essais périodiques. Mis à part l'absence de traitement par la substance d'essai, les animaux des groupes témoins sont manipulés et traités de la même manière que les animaux des groupes d'essai.

18. La sélection des doses et du véhicule suit les recommandations données dans les références (3) et (5). Des doses successives sont normalement choisies dans une série de concentrations appropriée telle que 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. Le choix de la série utilisée fait l'objet d'une justification scientifique. Le cas échéant, toutes les informations existantes d'ordre toxicologique (par exemple sur la toxicité aiguë et l'irritation cutanée), structural et physico-chimique sur la substance d'essai en question (et/ou des analogues de structure) sont prises en compte pour choisir les trois concentrations successives de manière que la plus élevée d'entre elles offre une exposition maximale tout en évitant la toxicité systémique et/ou une irritation cutanée locale excessive (3) (25). En l'absence de telles informations, un essai préliminaire peut s'avérer nécessaire (voir paragraphes 21-24).

19. Le véhicule ne doit pas perturber ou introduire un biais dans les résultats du test. Il est choisi de manière à optimiser la solubilité pour obtenir la concentration la plus élevée possible dans la préparation d'une solution/suspension adaptée à l'application de la substance d'essai. Les véhicules recommandés sont le mélange acétone/huile d'olive (4:1, v/v), le N,N-diméthylformamide, la méthyléthylcétone, le propylène glycol et le diméthylsulfoxyde (19) mais d'autres véhicules pourront également être utilisés à condition que ce choix soit suffisamment étayé sur le plan scientifique. Certaines situations réclameront un témoin supplémentaire, à savoir un solvant qui se justifie sur le plan clinique ou le mélange dans lequel la substance d'essai est commercialisée. L'expérimentateur veillera tout particulièrement à ce que les substances d'essai hydrophiles soient incorporées à un véhicule qui mouille la peau et ne ruisselle pas immédiatement, ce qui peut nécessiter l'ajout de solubilisants appropriés (par exemple Pluronic® L92 à 1 %). Il convient donc d'éviter les véhicules totalement aqueux.

20. Le traitement des ganglions lymphatiques de chaque souris permet d'évaluer la variabilité entre individus et de comparer statistiquement les réponses induites par la substance d'essai et par le véhicule témoin (voir paragraphe 35). En outre, il est envisageable de réduire le nombre d'animaux du groupe TP en se fondant sur des données individuelles (12). Du reste, certaines autorités réglementaires exigent la collecte de données pour chaque animal. D'autres autorités sont toutefois susceptibles d'accepter des données par groupe d'animaux, auquel cas le choix d'un relevé des résultats par animal ou par groupe est laissé à la discrétion des expérimentateurs.

Essai préliminaire

21. En l'absence d'informations permettant d'estimer la concentration d'essai maximale (voir paragraphe 18), il convient d'effectuer un essai préliminaire afin de déterminer le niveau des doses adaptées à l'ELGL. Cet essai préliminaire aide à quantifier la dose maximale à mettre en œuvre dans l'ELGL lorsqu'on ne dispose pas d'informations sur la concentration induisant une toxicité systémique (voir paragraphe 24) et/ou une irritation cutanée locale excessive (voir paragraphe 23). Cette concentration maximum de la substance d'essai est de 100 % pour les liquides, ou la plus élevée possible pour les solides et suspensions.

▼M3

22. Les conditions de l'essai préliminaire sont les mêmes que celles de l'ELGL, à ceci près qu'il n'y a pas d'évaluation de la prolifération dans les ganglions lymphatiques et que l'on peut inclure moins d'animaux par groupe de dose. En effet, on suggère d'utiliser seulement un à deux individus par groupe de dose. Il convient d'examiner toutes les souris quotidiennement afin de déceler d'éventuels signes cliniques de toxicité systémique ou d'irritation locale sur le site d'application. Les poids corporels sont consignés préalablement à l'essai et juste avant la fin (sixième jour). On examine les deux oreilles de chaque souris pour détecter la présence d'un éventuel érythème, le résultat étant noté conformément à l'échelle figurant dans le tableau 1 (25). L'épaisseur de l'oreille est mesurée à l'aide d'une jauge d'épaisseur (par exemple micromètre numérique ou jauge d'épaisseur Peacock Dial) le premier jour (avant toute application), le troisième jour (environ 48 heures après la première dose) et le sixième jour. De plus, le sixième jour, cette épaisseur peut être déterminée à partir du poids d'un échantillon d'oreille, prélevé après l'euthanasie des animaux. Les irritations cutanées locales excessives se traduisent par une cotation de l'érythème ≥ 3 et/ou un épaississement de l'oreille d'au moins 25 %, quel que soit le jour de la mesure (26) (27). La dose maximale choisie pour l'ELGL principal est la dose immédiatement inférieure dans la série de concentrations utilisée pour l'essai préliminaire (voir paragraphe 18) qui n'induit pas une toxicité systémique et/ou une irritation cutanée locale excessive.

Tableau 1

Cotation de l'érythème

Observation	Résultat
Pas d'érythème	0
Érythème très léger (à peine perceptible)	1
Érythème bien défini	2
Érythème modéré à grave	3
Érythème grave (rouge violacé) à formation d'escarre empêchant la cotation de l'érythème	4

23. Outre un épaississement de l'oreille de 25 % (26) (27), toute augmentation statistiquement significative de l'épaisseur de l'oreille chez les souris traitées par rapport aux individus témoins permet aussi d'identifier les produits irritants dans l'ELGL (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Cependant, les augmentations statistiquement significatives inférieures à 25 % ne sont pas systématiquement associées à une irritation excessive (30) (32) (33) (34).

24. Les observations cliniques suivantes peuvent indiquer une toxicité systémique (35) (36) dans le cadre d'une évaluation intégrée, et ainsi permettre d'estimer la dose maximale à utiliser dans l'ELGL principal: modifications des fonctions nerveuses (par exemple, piloérection, ataxie, tremblements et convulsions); changements du comportement (par exemple, agressivité, activités de toilettage modifiées, changement marqué d'intensité de l'activité); troubles respiratoires (en termes de fréquence et d'intensité de la respiration, sous forme de dyspnée, halètements ou râles), et modifications de la consommation d'aliments et d'eau. En outre, l'évaluation prendra en compte les éléments suivants: signes de léthargie et/ou absence de réceptivité, et tout signe clinique autre qu'une douleur ou un stress légers et passagers; baisse du poids corporel > 5 % entre le premier et le sixième jour; mortalité. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés (37).

▼M3

Programme expérimental de l'étude principale

25. Le programme expérimental se déroule comme suit:

— *Premier jour:* Mesurer et consigner le poids de chaque animal ainsi que toute observation clinique. Appliquer 25 µl d'une dilution adaptée de la substance d'essai, du véhicule seul ou du TP (concurrent ou récent selon les pratiques du laboratoire, voir paragraphes 11-15) au dos de chaque oreille.

— *Deuxième et troisième jours:* Répéter la procédure d'application pratiquée le premier jour.

— *Quatrième et cinquième jours:* Aucun traitement.

— *Sixième jour:* Noter le poids de chaque animal. Injecter 250 µl d'une solution tampon phosphate stérile [phosphate-buffered saline] (PBS) contenant 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) de (^{3}H)-méthylthymidine dans la veine caudale de toutes les souris traitées et témoins. Il est également possible d'injecter 250 µL de PBS stérile contenant 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) de ^{125}I-iododésoxyuridine et de la fluorodésoxyuridine à 10^{-5} M dans la veine caudale de toutes les souris. Euthanasier les animaux cinq heures (5 h) plus tard. Exciser les ganglions lymphatiques auriculaires de drainage de chaque oreille de souris, puis placer ceux d'un même individu dans une solution de PBS (approche par animal), ou placer tous les ganglions lymphatiques d'un même groupe de traitement dans la même solution PBS (approche par groupe). Les détails et diagrammes relatifs à l'identification et à la dissection des ganglions lymphatiques sont présentés dans la référence (12). Pour approfondir le suivi de la réponse cutanée locale dans l'essai principal, des paramètres supplémentaires comme la cotation de l'érythème auriculaire ou les mesures de l'épaisseur de l'oreille (obtenues à l'aide d'une jauge d'épaisseur ou par pesée d'échantillons d'oreilles après nécropsie) peuvent être inclus dans le protocole d'étude.

Préparation des suspensions cellulaires

26. Pour l'approche par animal comme pour l'approche par groupe, les cellules de ganglions lymphatiques (CGL) excisés bilatéralement sont dispersées par le biais d'une désagrégation mécanique douce à travers un tamis en acier inoxydable à 200 microns, ou de toute autre technique acceptable pour obtenir une suspension unicellulaire. Les CGL sont lavées deux fois avec un excès de PBS et l'ADN précipite par l'action d'acide trichloracétique à 5 % à 4 °C pendant 18 heures (3). Les granules sont soit remis en suspension dans 1 mL d'acide trichloracétique et transférés dans des flacons à scintillation contenant 10 mL de scintillateur liquide pour le comptage des ^{3}H, soit transférés directement dans des tubes de comptage gamma pour le comptage de ^{125}I.

Détermination de la prolifération cellulaire (radioactivité incorporée)

27. L'incorporation de la ^{3}H-méthylthymidine se mesure par comptage à β-scintillation en désintégrations par minute (DPM). L'incorporation de ^{125}I-iododésoxyuridine, mesurée par comptage de ^{125}I, s'exprime également en DPM. En fonction de l'approche adoptée, l'incorporation s'exprimera en DPM/souris (approche par animal) ou en DPM/groupe de traitement (approche par groupe).

ELGL simplifié (ELGLs)

28. Si la réglementation demande de confirmer les prévisions négatives quant au pouvoir de sensibilisation cutanée, il est possible de mettre en œuvre l'ELGLs (16) (17) (18), qui requiert moins d'animaux, à condition de rester en conformité avec toutes les autres dispositions du protocole ELGL décrit dans la présente méthode d'essai. Tout recours à l'approche ELGL simplifiée doit être préalablement justifié, avec le détail des raisons scientifiques étayant ce choix. Si l'ELGLs donne une réponse positive ou équivoque, des essais supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires pour interpréter ou clarifier le résultat.

▼M3

29. La seule différence entre les méthodes ELGL et ELGLs est la réduction du nombre de groupes de dose; c'est pourquoi l'ELGLs ne livre pas d'informations sur la relation dose-effet. Par voie de conséquence, l'ELGLs ne saurait être appliqué lorsque des données sont nécessaires en la matière. Tout comme pour la méthode ELGL utilisant plusieurs doses, la concentration maximale de substance d'essai choisie pour l'ELGLs correspond à la concentration maximale n'induisant pas de toxicité systémique manifeste et/ou d'irritation cutanée locale excessive chez la souris (voir paragraphe 18).

OBSERVATIONS

Observations cliniques

30. Au moins une fois par jour, l'expérimentateur examinera attentivement chaque souris afin de déceler d'éventuels signes cliniques, se traduisant par une irritation locale sur le site d'application ou une toxicité systémique. Toutes les observations sont systématiquement consignées pour chaque souris. Les programmes de suivi intègrent les critères permettant d'identifier rapidement les souris montrant des signes de toxicité systémique, d'irritation cutanée locale excessive ou de corrosion de la peau, afin qu'elles puissent être euthanasiées (37).

Poids corporels

31. Comme indiqué au paragraphe 25, le poids corporel de chaque animal est mesuré au début de l'essai et au moment programmé pour l'euthanasie.

CALCUL DES RÉSULTATS

32. Les résultats obtenus pour chaque groupe de traitement sont exprimés par un indice de stimulation (IS). Pour l'approche par animal, cet IS s'obtient en divisant la moyenne des DPM/souris dans chaque groupe ayant reçu la substance d'essai ou le TP par la moyenne des DPM/souris dans le groupe témoin traité avec le solvant/véhicule. L'indice de stimulation moyen pour les témoins traités avec le véhicule est alors égal à 1. Pour l'approche par groupe, l'IS s'obtient en divisant l'incorporation du produit radiomarqué dans chaque groupe de traitement par l'incorporation observée dans le groupe témoin traité avec le solvant/véhicule: on obtient alors un IS moyen.

33. Un résultat est considéré comme positif lorsque l'indice de stimulation est supérieur ou égal à 3. Toutefois, l'intensité de la relation dose-effet, la signification statistique et la cohérence des réponses obtenues avec le solvant/véhicule et le TP constituent autant de facteurs pour décider si un résultat limite est jugé positif (4) (5) (6).

34. Pour clarifier les résultats, diverses propriétés de la substance d'essai sont prises en compte, parmi lesquelles une éventuelle analogie structurelle avec des sensibilisants cutanés connus, le déclenchement d'une irritation cutanée excessive chez la souris, et la nature de la relation dose-effet observée. Ces considérations, ainsi que d'autres, sont examinées en détail dans un autre document (7).

35. Le relevé des données radioactives pour chaque souris permet de déterminer statistiquement l'existence et l'importance d'une relation dose-effet dans les résultats. Tout traitement statistique peut comprendre une évaluation de la relation dose-effet ainsi que des comparaisons des groupes d'essai convenablement adaptées (par exemple comparaison par paires des groupes de dose avec le groupe solvant/véhicule témoin concurrent). Les analyses statistiques peuvent notamment inclure une régression linéaire ou le test de Williams pour étudier la fonction dose-effet, ainsi que le test de Dunnett pour les comparaisons par paires. Pour choisir une méthode appropriée d'analyse statistique, le chercheur doit être conscient du risque d'inégalité des variances et d'autres problèmes connexes qui pourraient nécessiter une transformation des données ou une analyse statistique non paramétrique. Quoi qu'il en soit, l'investigateur peut être amené à calculer les indices de stimulation et effectuer les traitements statistiques avec ou sans certains points de données (parfois appelés «valeurs aberrantes»).

▼M3

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

36. Les résultats sont récapitulés sous forme de tableau. Avec l'approche par animal, indiquer les DPM relevées pour chaque individu, la moyenne des DPM/souris du groupe, la marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) et l'indice de stimulation moyen pour chaque groupe de dose par rapport au groupe solvant/véhicule témoin concurrent. Avec l'approche par groupe, indiquer la moyenne et la médiane des DPM ainsi que la moyenne des IS de chaque groupe de dose par rapport au groupe solvant/véhicule témoin concurrent.

Rapport d'essai

37. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Substance d'essai et substances témoins:

— données d'identification (par exemple numéro CAS et numéros CE, le cas échéant; source; pureté; impuretés connues; numéro de lot),

— état physique et propriétés physico-chimiques (par exemple volatilité, stabilité, solubilité),

— s'il s'agit d'un mélange: composition et pourcentages relatifs des constituants.

Solvant/véhicule:

— données d'identification (pureté; concentration, s'il y a lieu; volume utilisé),

— justification du choix du véhicule.

Animaux d'essai:

— source des souris CBA,

— état microbiologique des animaux, s'il est connu,

— nombre et âge des animaux,

— source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.

Conditions d'essai:

— détails concernant la préparation et l'application de la substance d'essai,

— justification du choix des doses (y compris résultats de l'essai préliminaire, le cas échéant),

— concentrations utilisées pour le véhicule et la substance d'essai, et quantité totale de substance d'essai appliquée,

— détails concernant la nourriture et la qualité de l'eau (y compris type et source de nourriture, et provenance de l'eau),

— détails concernant le programme de traitement et d'échantillonnage,

— méthodes de détermination de la toxicité,

— critères de décision concernant les études positives ou négatives,

— détails concernant tout écart par rapport au protocole et explication de la manière dont l'écart modifie la conception de l'essai et ses résultats.

Vérification de la fiabilité:

— résumé des résultats du dernier test de fiabilité, notamment informations sur la substance d'essai, sa concentration et le véhicule utilisé,

— résultats du laboratoire pour le TP concurrent et/ou historique ainsi que pour le TN concurrent,

▼**M3**

— en l'absence d'un TP concurrent, date et rapport de laboratoire du dernier essai périodique du TP, et rapport détaillant les résultats historiques du TP spécifiques au laboratoire de manière à justifier pourquoi aucun TP concurrent n'a été mis en œuvre.

Résultats:

— poids corporel de chaque souris au début du traitement et au moment programmé pour l'euthanasie; moyenne et marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) pour chaque groupe de dose,

— moment du déclenchement des effets et signes de toxicité, y compris l'irritation cutanée sur le site d'administration, pour chaque animal,

— tableau des DPM et IS pour chaque souris (approche par animal) ou moyenne et médiane des DPM et IS (approche par groupe) pour chaque groupe de traitement,

— moyenne et marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) des DPM/souris pour chaque groupe de dose, et résultats de l'analyse des valeurs aberrantes au sein de chacun d'eux en cas d'approche par animal,

— indices de stimulation obtenus, et détermination appropriée de la variabilité prenant en compte les variations entre animaux à la fois dans les groupes ayant reçu la substance d'essai et dans les groupes témoins, en cas d'approche par groupe,

— relation dose-effet,

— analyses statistiques, s'il y a lieu.

Discussion des résultats:

— bref commentaire sur les résultats, analyse de la relation dose-effet et analyses statistiques, s'il y a lieu, et conclusion quant au fait de savoir si la substance d'essai doit être considérée comme un sensibilisant cutané.

BIBLIOGRAPHIE

1. OCDE (2002), Sensibilisation cutanée: essai des ganglions lymphatiques locaux, Ligne directrice n° 429, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

2. Kimber, I., et Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, Food Chem. Toxicol., 30, 165-169.

3. Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. et Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, Toxicol., 93, 13-31.

4. Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. et Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, J. Toxicol. Environ. Health, 53, 563-79.

5. Chamberlain, M., et Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, Food Chem. Toxicol., 34, 999-1002.

6. Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I., et Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, Food Chem. Toxicol., 34, 985-997.

7. Basketter, D.A., Gerberick, G.F., et Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, Food Chem. Toxicol., 36, 327-33.

▼M3

8. Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, Toxicol., 146, 49-59.

9. Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, Reg. Toxicol. Pharmacol, 34(3): 258-273.

10. Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, Reg. Toxicol. Pharmacol, 34(3), 274-286.

11. Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, Reg. Toxicol. Pharmacol, 34(3): 249-257.

12. ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

13. OCDE (1992), Sensibilisation de la peau, Ligne directrice n° 406, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

14. OCDE (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Série sur les essais et évaluations n° 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

15. Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A., et Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, J. Appl. Toxicol., 18, 281-284.

16. Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y., et Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? Contact Dermatitis, 54, 181-185.

17. ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, Avril 2007. Disponible à l'adresse suivante: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]

18. ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report, The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

19. ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

▼**M3**

20. Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. et Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

21. Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. et Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

22. ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report, Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

23. ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7e édition. Washington, DC: National Academies Press.

24. McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, 71-89.

25. OCDE (2002), Effet irritant/corrosif aigu sur la peau, Ligne directrice no 404, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html

26. Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. et DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96 (S-1), 235.

27. ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf]

28. Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S., et Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195-206.

29. Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. et Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83-94.

30. Woolhiser, M.R., Hayes, B.B., et Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, Toxicol. Meth., 8, 245-256.

31. Hayes, B.B., et Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, Drug. Chem. Toxicol., 22, 491-506.

32. Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. et Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round, Toxicol., 212, 60-68.

33. Vohr, H.W., and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721-728.

34. Patterson, R.M., Noga, E. et Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, Environ. Health Perspect., 115, 1023-1028.

35. OCDE (1987), Toxicité cutanée aiguë, Ligne directrice no 402, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

▼**M3**

36. ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

37. OCDE (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Série sur les essais et évaluations n° 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

▼M3

Appendice 1

Normes de performance pour l'évaluation des méthodes d'ELGL similaires ou modifiées proposées pour les essais de sensibilisation cutanée

INTRODUCTION

1. L'objectif des normes de performance est d'indiquer sur quelles bases évaluer la précision et la fiabilité de nouvelles méthodes d'essai vis-à-vis d'objectifs définis, que ces méthodes soient protégées ou non (par des droits d'auteur, une marque déposée ou un enregistrement). Conçues à partir de méthodes d'essai validées et acceptées, ces normes peuvent également servir à évaluer la précision et la fiabilité de méthodes analogues (aussi appelées «répliques d'essais») fondées sur des principes scientifiques similaires et permettant de quantifier ou prévoir le même effet biologique ou toxique (14).

2. Avant d'adopter des méthodes modifiées, c'est-à-dire des améliorations proposées d'une méthode d'essai approuvée, il convient de déterminer quel peut être l'effet des modifications envisagées sur les performances de l'essai, et dans quelle mesure ces modifications influent sur les informations disponibles pour les autres éléments du processus de validation. En fonction du nombre et de la nature des changements proposés, des données générées et des documents justificatifs associés, le processus de validation est le même que pour un nouvel essai ou, le cas échéant, limité à une évaluation de la fiabilité et de la pertinence sur la base des normes de performance établies (14).

3. La fiabilité et la précision des méthodes similaires ou modifiées proposées dans la présente méthode d'essai sont évaluées à l'aide de produits chimiques représentant l'éventail complet des résultats de l'ELGL. Afin d'éviter toute utilisation injustifiée d'animaux, il est fortement conseillé aux concepteurs de modèles de contacter les autorités appropriées avant d'entamer les études de validation conformément aux normes de performance et orientations fournies dans la présente méthode d'essai.

4. Ces normes de performance, qui sont fondées sur les normes harmonisées émanant du comité de coordination interagences pour la validation des méthodes alternatives (ICCVAM) aux États-Unis, du Centre européen pour la validation des méthodes alternatives (ECVAM) et du Centre japonais pour la validation des méthodes alternatives (JaCVAM) (12), permettent d'évaluer la validité de versions de l'ELGL similaires ou modifiées. Les normes de performance comprennent les éléments essentiels de la méthode d'essai, les produits chimiques de référence recommandés, et les minima requis en termes de précision et de fiabilité.

I. **Éléments essentiels de la méthode d'essai**

5. Pour s'assurer qu'une méthode d'ELGL similaire ou modifiée est fonctionnellement et structurellement similaire à l'ELGL et qu'elle mesure le même effet biologique, il convient d'inclure les éléments suivants dans le protocole d'essai:

— la substance d'essai est appliquée localement sur les deux oreilles de la souris,

— la prolifération des lymphocytes est quantifiée dans les ganglions lymphatiques qui drainent le site de l'application de la substance d'essai,

— la prolifération des lymphocytes est mesurée pendant la phase d'induction de la sensibilisation cutanée,

▼**M3**

— la dose maximale choisie pour la substance d'essai est la concentration maximale ne provoquant pas de toxicité systémique et/ou d'irritation cutanée locale excessive chez la souris. Pour les produits chimiques de référence positifs, la dose maximale doit être supérieure ou égale aux CE3 de l'ELGL pour les produits chimiques de référence correspondants (voir tableau 1) sans pour autant induire de toxicité systémique et/ou d'irritation cutanée locale excessive chez la souris,

— chaque étude comprend un véhicule témoin concurrent et, s'il y a lieu, un témoin positif concurrent,

— chaque groupe de dose comprend au moins quatre animaux,

— les données peuvent être collectées par animal ou par groupe d'animaux.

En cas de non-respect d'un de ces critères, les présentes normes de performance ne permettent pas de valider les méthodes similaires ou modifiées.

II. **Liste minimale de produits chimiques de référence**

6. On trouve dans les normes de performance harmonisées émanant du Comité de coordination interagences pour la validation des méthodes alternatives (ICCVAM) aux États-Unis, du Centre européen pour la validation des méthodes alternatives (ECVAM) et du Centre japonais pour la validation des méthodes alternatives (JaCVAM) (12) un minimum de 18 produits chimiques de référence à utiliser, auxquelles s'ajoutent quatre autres substances de référence facultatives. Ces quatre substances donnent des faux positifs ou faux négatifs avec l'ELGL, ce qui n'arrive pas avec les essais sur l'homme ou le cobaye (chapitre B.6 ou LD 406 de l'OCDE) (13), et permet de démontrer une performance supérieure ou égale à celle de l'ELGL. Le choix de ces produits chimiques s'appuie sur les critères suivants:

— la liste de produits chimiques de référence représente, d'une part, les types de substances dont on teste généralement le pouvoir de sensibilisation cutanée et, d'autre part, l'éventail des effets détectables ou prévisibles par l'ELGL,

— ces substances présentent des structures chimiques bien définies,

— des données ELGL provenant d'essais sur cobayes (d'après le chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (13) et (si possible) sur l'homme sont disponibles pour chaque substance, et

— ces substances sont disponibles dans le commerce.

La liste des produits chimiques de référence recommandés est présentée dans le tableau 1. Les études utilisant les produits chimiques de référence proposés sont mises en œuvre avec le véhicule correspondant indiqué sur la liste du tableau 1. Si l'une des substances de référence de la liste n'est pas disponible, il est possible de recourir à d'autres substances répondant aux critères de sélection susmentionnés, en justifiant la démarche de manière appropriée.

▼M3

Tableau 1

Produits chimiques de référence recommandés pour les normes de performance ELGL

Numéro	Produit chimique ([1])	N° CAS	État	Véh ([2])	CE3 % ([3])	N ([4])	0,5 x CE3 - 2,0 x CE3	Fourchette des CE3 mesurées	ELGL vs. cobaye	ELGL vs. homme
1	5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one (CMI)/2-méthyl-4-isothiazolin-3-one (MI) ([5])	26172-55-4/ 2682-20-4	Liq	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sol	AHO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-phénylènediamine	106-50-3	Sol	AHO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	chlorure de cobalt	7646-79-9	Sol	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	isoeugénol	97-54-1	Liq	AHO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-mercaptobenzothiazole	149-30-4	Sol	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NC	+/+	+/+
7	citral	5392-40-5	Liq	AHO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Liq	AHO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	eugénol	97-53-0	Liq	AHO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	benzoate de phényle	93-99-2	Sol	AHO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	alcool cinnamique	104-54-1	Sol	AHO	21	1	10,5-42	NC	+/+	+/+
12	imidazolidinylurée	39236-46-9	Sol	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	méthacrylate de méthyle	80-62-6	Liq	AHO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	chlorobenzène	108-90-7	Liq	AHO	25	1	n.a.	n.a.	–/–	–/ (*)
15	isopropanol	67-63-0	Liq	AHO	50	1	n.a.	n.a.	–/–	–/+

▼M3

Numéro	Produit chimique (1)	N° CAS	État	Véh (2)	CE3 % (3)	N (4)	0,5 x CE3 - 2,0 x CE3	Fourchette des CE3 mesurées	ELGL vs. cobaye	ELGL vs. homme
16	acide lactique	50-21-5	Liq	DMSO	25	1	n.a.	n.a.	–/–	–/ (*)
17	salicylate de méthyle	119-36-8	Liq	AHO	20	9	n.a.	n.a.	–/–	–/–
18	acide salicylique	69-72-7	Sol	AHO	25	1	n.a.	n.a.	–/–	–/–
Substances facultatives démontrant une amélioration des performances par rapport à l'ELGL										
19	sodium lauryl sulfate	151-21-3	Sol	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/–	+/–
20	diméthacrylate d'éthylène glycol	97-90-5	Liq	MEC	28	1	14-56	NC	+/–	+/+
21	xylène	1330-20-7	Liq	AHO	95,8	1	47,9-100	NC	+/ (**)	+/–
22	chlorure de nickel	7718-54-9	Sol	DMSO	5	2	n.a.	n.a.	–/+	–/+

Abréviations: AHO = acétone/huile d'olive (4:1, v/v); N° CAS = Numéro attribué par le Chemical Abstracts Service; DMF = N,N-diméthylformamide; DMSO = diméthylsulfoxyde; DNCB = 2,4-dinitrochlorobenzène; CE3 = concentration estimée nécessaire pour produire un indice de stimulation de 3; cobaye = résultats obtenus sur cobayes (d'après B.6 ou la LD 406 de l'OCDE) (13); HCA = hexyl cinnamaldéhyde; Liq = liquide; ELGL = résultats sur murins de l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (d'après B.42 ou la LD 429 de l'OCDE) (1); MEC = méthyléthylcétone; n.a. = non applicable puisque l'indice de stimulation est inférieur à 3; NC = non calculée puisque les données proviennent d'une seule étude; Sol = solide; Véh = véhicule d'essai.

(*) Supposé non sensibilisant chez l'homme, dans la mesure où: on ne repère aucun résultat d'essai clinique épicutané; le produit n'est pas compris dans les kits de test épicutané des allergènes; on ne trouve aucun rapport de cas faisant état d'une sensibilisation chez l'homme.

(**) Données sur cobayes indisponibles.

(1) Les produits chimiques sont préparés chaque jour à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'on peut les stocker.

(2) En raison de l'impact éventuel des différents véhicules sur la performance de l'ELGL, il convient d'utiliser le véhicule recommandé pour chaque produit chimique de référence (24) (32).

(3) Il s'agit d'une valeur moyenne lorsque plusieurs CE3 sont disponibles. Pour les substances négatives (indice de stimulation < 3), la concentration maximale de l'essai est fournie.

(4) Nombre d'études ELGL dont découlent les données.

(5) Disponible dans le commerce sous forme de Kathon CG (N° CAS 55965-84-9), un mélange de CMI et MI à 3:1. Les concentrations relatives de ces composés sont situées entre 1,1 % et 1,25 % pour la CMI, 0,3 % et 0,45 % pour la MI. Les composés inactifs sont des sels de magnésium (21,5 % à 24 %) et le nitrate de cuivre (0,15 % à 0,17 %), le reste de la formulation étant constitué de 74 % à 77 % d'eau. Le Kathon CG est disponible chez Sigma-Aldrich et Rohm and Haas (devenu Dow Chemical Corporation).

▼**M3**

III. **Normes de fiabilité et de précision**

7. La précision d'une méthode d'ELGL similaire ou modifiée se doit d'égaler au moins les minima des normes ELGL dans le cadre d'une évaluation effectuée à l'aide des 18 produits chimiques de référence au minimum à utiliser. La méthode d'essai modifiée ou nouvelle devrait permettre de classer correctement les substances comme étant positives ou négatives. Cependant, elle ne devrait pas forcément permettre de classer comme il convient l'ensemble des 18 produits chimiques de référence au minimum à utiliser. Si, par exemple, l'un des sensibilisants légers est mal classé, l'essai pourra toutefois être considéré comme présentant des performances équivalentes à condition de fournir les raisons expliquant cette conclusion erronée, ainsi que des données supplémentaires pertinentes (par exemple des résultats corrects obtenus pour d'autres substances dont les propriétés physiques, chimiques et sensibilisantes sont analogues à celles du produit chimique de référence). Dans ces conditions, la validation d'une telle méthode d'ELGL modifiée ou nouvelle fera l'objet d'un examen au cas par cas.

Reproductibilité intralaboratoire

8. La reproductibilité intralaboratoire d'une méthode d'ELGL modifiée ou nouvelle est déterminée à l'aide d'un sensibilisant bien caractérisé par ELGL. En conséquence, les normes de performance de l'ELGL s'appuient sur la variabilité des résultats obtenus lors d'essais répétés avec de l'hexyl cinnamaldéhyde (HCA). La reproductibilité intralaboratoire est évaluée par comparaison des concentrations estimées minimales (CEm) obtenues avec l'HCA lors de quatre essais répétés à intervalles d'une semaine au moins. Cette reproductibilité intralaboratoire est jugée acceptable lorsqu'un laboratoire parvient à obtenir des CEm situées entre 5 % et 20 % pour chaque essai avec l'HCA, ce qui correspond à 0,5-2,0 fois la CE3 moyenne spécifiée pour l'HCA (10 %) dans l'ELGL (voir tableau 1).

Reproductibilité interlaboratoires

9. La reproductibilité interlaboratoires d'une méthode d'ELGL modifiée ou nouvelle est déterminée à l'aide de deux sensibilisants bien caractérisés par ELGL. Les normes ELGL s'appuient sur la variabilité des résultats d'essais effectués sur l'HCA et le 2,4-dinitrochlorobenzène (DNCB) dans différents laboratoires. Les CEm respectives découlent d'études individuelles menées dans au moins trois laboratoires séparés. La reproductibilité interlaboratoires est jugée acceptable lorsque chaque laboratoire obtient des CEm situées entre 5 % et 20 % pour chaque essai avec l'HCA et entre 0,025 % et 0,1 % pour le DNCB, ce qui correspond à 0,5-2,0 fois la CE3 moyenne spécifiée respectivement pour l'HCA (10 %) et le DCNB (0,05 %) dans l'ELGL (voir tableau 1).

▼**M3**

Appendice 2

Définitions

Assurance qualité: procédé de gestion dans lequel le respect des normes d'essai, des obligations du laboratoire et des procédures d'enregistrement des données, ainsi que la précision du transfert des données, sont évalués par des personnes indépendantes de celles qui réalisent les essais.

Concentration estimée minimale (CEm): concentration estimée d'une substance d'essai nécessaire pour produire un indice de stimulation indiquant une réponse positive.

Concentration estimée trois (CE3): concentration estimée d'une substance d'essai nécessaire pour produire une réponse correspondant à un indice de stimulation égal à trois.

Faux négatif: substance d'essai identifiée à tort comme négative ou inactive à l'issue de l'essai, alors qu'elle est en fait positive ou active (14).

Faux positif: substance d'essai identifiée à tort comme positive ou active à l'issue de l'essai, alors qu'elle est en fait négative ou inactive (14).

Fiabilité: mesure dans laquelle la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intralaboratoire et interlaboratoires (14).

Indice de stimulation (IS): paramètre d'évaluation du potentiel de sensibilisation cutanée d'une substance d'essai, calculé comme le quotient de la prolifération mesurée dans les groupes traités sur celle du groupe témoin concurrent recevant le véhicule.

Méthode d'essai protégée: méthode d'essai dont la fabrication et la distribution sont protégées par des brevets, droits d'auteur, marques, etc.

Méthode d'essai validée: méthode d'essai ayant fait l'objet d'études de validation visant à déterminer sa pertinence (notamment sa précision) et sa fiabilité à des fins spécifiques. Il importe de noter que les performances d'une méthode d'essai validée peuvent être insuffisantes en termes de précision et de fiabilité pour qu'elle soit jugée acceptable pour les besoins envisagés (14).

Normes de performance: normes, fondées sur une méthode d'essai validée, permettant d'évaluer la comparabilité d'une méthode d'essai proposée, structurellement et fonctionnellement similaire. Elles comprennent: i) les éléments essentiels de la méthode d'essai; ii) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi ceux utilisés pour démontrer les performances acceptables de la méthode d'essai validée; et iii) les niveaux de précision et de fiabilité, similaires à ceux obtenus pour la méthode d'essai validée, que la méthode d'essai proposée doit présenter lorsqu'on l'évalue à l'aide des produits chimiques de référence de la liste minimale (14).

Pertinence: description de la relation entre l'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité à des fins spécifiques. Elle définit le degré auquel l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (14).

Précision: degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa pertinence. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de «concordance» pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (14).

Produits chimiques de référence: produits chimiques choisis pour être utilisés dans le processus de validation, dont les réponses dans le système d'essai de référence in vitro ou in vivo ou sur l'espèce d'intérêt sont déjà connues. Ils doivent être représentatifs des classes de produits chimiques auxquelles il est prévu d'appliquer la méthode d'essai, et couvrir la gamme complète des réponses attendues des produits chimiques pour lesquels elle est conçue, qu'elles soient fortes, faibles ou négatives. Les différentes étapes du processus de validation, ainsi que différentes méthodes d'essai et utilisations d'essais, peuvent exiger des groupes de produits chimiques de référence différents (14).

▼**M3**

Réplique d'essai: méthode d'essai structurellement et fonctionnellement similaire à une méthode de référence validée et acceptée. Une telle méthode d'essai peut éventuellement faire l'objet d'une validation accélérée. Synonyme de méthode d'essai similaire (14).

Reproductibilité interlaboratoires: mesure du degré auquel différents laboratoires qualifiés qui emploient le même protocole et testent les mêmes substances d'essai peuvent produire des résultats similaires en termes de qualité et de quantité. La reproductibilité interlaboratoires est déterminée au cours des processus de prévalidation et de validation, et indique dans quelle mesure un essai peut être transféré sans problème entre laboratoires. On parle aussi de reproductibilité entre laboratoires (14).

Reproductibilité intralaboratoire: détermination du degré auquel divers membres du personnel qualifié d'un même laboratoire réussissent à obtenir des résultats identiques en ayant recours à un protocole spécifique à des moments différents. On parle aussi de reproductibilité au sein du laboratoire (14).

Risque: éventualité d'un effet indésirable sur la santé ou l'environnement. L'effet indésirable se manifeste uniquement lorsque le niveau d'exposition est suffisant.

Sensibilisation cutanée: processus immunologique résultant de l'exposition topique d'un sujet sensible à un allergène chimique inducteur, et qui se traduit par une réaction immunologique cutanée pouvant entraîner le développement d'une sensibilisation de contact.

Substance d'essai (également dénommée substance chimique d'essai): toute substance et tout mélange testés selon la présente méthode d'essai.

Substance étalon: substance sensibilisante ou non sensibilisante utilisée comme référence pour comparer les effets d'une substance d'essai. Une substance étalon doit posséder les propriétés suivantes: i) provenir d'une ou de plusieurs sources régulières et fiables; ii) présenter une similitude structurale et fonctionnelle avec la classe des substances testées; iii) posséder des caractéristiques physico-chimiques connues; iv) être accompagnée de données confirmant ses effets connus; et v) avoir une puissance connue dans l'intervalle de la réponse désirée.

Valeur aberrante: une valeur aberrante est une valeur observée qui diffère nettement des autres valeurs dans un échantillon aléatoire d'une population.

▼B

B.43. **ÉTUDE DE NEUROTOXICITÉ CHEZ LES RONGEURS**

1. **MÉTHODE**

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 424 (1997) de l'OCDE.

Cette méthode d'essai a été conçue dans le but de recueillir des données permettant de confirmer ou de mieux caractériser la neurotoxicité potentielle d'une substance pour des animaux adultes. Elle peut être utilisée en association avec d'autres méthodes d'essai dans le cadre d'études de toxicité à dose répétée ou seule, en tant qu'étude indépendante. Il est recommandé de consulter le document d'orientation de l'OCDE sur les stratégies d'essais en matière de neurotoxicité (1). Cette recommandation est particulièrement importante lorsqu'on envisage de s'écarter des observations et des protocoles d'essai préconisés dans cette méthode. Le document d'orientation est également utile pour choisir un protocole d'essai adapté à un cas spécifique.

L'évaluation de la neurotoxicité développementale n'est pas l'objet de la présente méthode.

1.1. INTRODUCTION

Dans l'évaluation des propriétés toxiques d'un produit chimique, il est important de prendre en considération la possibilité d'effets neurotoxiques. La méthode d'essai concernant la toxicité systémique à dose répétée permet déjà un premier tri des substances potentiellement neurotoxiques. La présente méthode peut être utilisée pour obtenir des informations complémentaires sur les effets neurotoxiques observés dans les études de toxicité systémique à dose répétée, et éventuellement pour confirmer ces effets. Cependant, la neurotoxicité potentielle de substances appartenant à certaines catégories pourra être évaluée de façon plus appropriée en appliquant directement la présente méthode, sans recueillir au préalable les indications qui peuvent être fournies par les études de toxicité systémique à dose répétée. Ce sera notamment le cas lorsque:

— des signes de neurotoxicité ou des lésions neuropathologiques sont observés dans des études de toxicité autres que des études de toxicité systémique à dose répétée, ou

— lorsque les substances présentent des similitudes de structure ou ont d'autres caractéristiques en commun avec des substances neurotoxiques connues.

Cette méthode peut aussi être utile dans d'autres cas; voir référence (1) pour plus de détails.

Cette méthode a été conçue de manière à pouvoir être adaptée, en fonction des besoins spécifiques, aussi bien pour confirmer la neurotoxicité histopathologique d'une substance chimique ou sa neurotoxicité sur le plan du comportement que pour caractériser et quantifier les neurotoxiques.

▼B

Autrefois, la neurotoxicité était assimilée à une forme de neuropathie englobant des lésions neuropathologiques ou des dysfonctionnements neurologiques tels que apoplexie, paralysie ou tremblements. Bien que la neuropathie soit une manifestation importante de la neurotoxicité, il apparaît aujourd'hui clairement qu'il existe de nombreux autres signes de toxicité pour le système nerveux (par exemple, perte de la coordination motrice, déficits sensoriels, diminution de la faculté d'apprentissage et de la mémoire) qui ne sont pas toujours mis en évidence par les études neuropathologiques ou autres.

La présente méthode d'essai de neurotoxicité vise à détecter, chez les rongeurs adultes, les effets importants sur le comportement et les effets neuropathologiques. Bien que des effets sur le comportement, même s'ils ne sont pas accompagnés de changements morphologiques, puissent révéler un impact néfaste sur l'organisme, les changements de comportement ne sont pas tous spécifiques du système nerveux. Par conséquent, tout changement observé doit être évalué par rapport aux données histopathologiques, hématologiques ou biochimiques correspondantes et aux résultats d'autres études de toxicité systémique. Les essais préconisés par la présente méthode pour caractériser et quantifier les réponses neurotoxiques comprennent des procédures histopathologiques et des procédures spécifiquement axées sur le comportement, qui pourront être étayées par des études électrophysiologiques et/ou biochimiques (1) (2) (3) (4).

Les agents neurotoxiques peuvent agir sur différentes cibles dans le système nerveux, et cela par différents mécanismes. Comme il est impossible de concevoir une seule série d'essais permettant d'évaluer de manière approfondie le potentiel neurotoxique de toutes les substances, il peut s'avérer nécessaire de mettre en œuvre d'autres essais in vivo ou in vitro spécifiques du type de neurotoxicité observé ou escompté.

La présente méthode d'essai peut également servir, en association avec le document d'orientation de l'OCDE sur les stratégies et les méthodes d'essais en matière de neurotoxicité, à concevoir des études destinées à mieux caractériser la relation dose-effet ou à en améliorer la sensibilité, en vue d'obtenir une meilleure estimation de la concentration sans effet nocif observé ou de mettre en évidence les dangers connus ou suspectés de la substance. On peut ainsi concevoir des études pour identifier et évaluer le ou les mécanisme(s) neurotoxiques ou pour compléter des données déjà fournies par l'application de protocoles de base d'observations du comportement et d'observations neuropathologiques. Lors de ces études, il est inutile de chercher à obtenir en double des données qui seraient de toute façon obtenues en suivant les protocoles préconisés par cette méthode, si ces données sont déjà disponibles et ne sont pas nécessaires pour l'interprétation des résultats de l'étude.

Les informations recueillies dans cette étude de neurotoxicité, qu'elle soit réalisée de façon indépendante ou couplée à d'autres études, permettent de:

— déterminer si les effets de la substance chimique sur le système nerveux sont permanents ou réversibles,

— mieux caractériser les altérations du système nerveux qui sont liées à l'exposition à la substance et faciliter la compréhension du mécanisme sous-jacent,

▼B

— déterminer les relations entre dose et effet et entre temps et effet afin de pouvoir estimer la concentration sans effet nocif observé (laquelle pourra servir à établir les critères de sécurité de la substance).

Dans cette méthode, la substance d'essai est administrée par voie orale. Si d'autres voies, comme la voie dermique ou l'inhalation, paraissent plus appropriées, des modifications des procédures recommandées s'imposent. Le choix de la voie d'administration est dicté par les circonstances de l'exposition humaine et par les informations toxicologiques ou cinétiques disponibles.

1.2. DÉFINITIONS

Effet nocif: toute altération par rapport à une situation de référence, qui est due au traitement et qui diminue l'aptitude d'un organisme à survivre, à se reproduire ou à s'adapter à l'environnement.

Dose: la quantité de substance d'essai administrée. La dose s'exprime en poids (g, mg) de substance d'essai ou en poids de substance d'essai par unité de poids de l'animal d'expérience (par exemple mg/kg) ou en concentration dans le régime (ppm).

Dosage: un terme général qui comprend la dose, la fréquence et la durée de l'administration.

Neurotoxicité: une altération de la structure ou de la fonction du système nerveux qui est la conséquence d'une exposition à un agent chimique, biologique ou physique.

Agent neurotoxique: tout agent chimique, biologique ou physique capable d'induire une neurotoxicité.

CSENO: concentration maximale dans effet nocif observé, c'est-à-dire la dose la plus élevée à laquelle aucun effet nocif imputable au traitement n'est observé.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance à tester est administrée par voie orale à différents niveaux de dose à plusieurs groupes de rongeurs. L'administration se fait généralement à doses répétées sur une période qui peut être de 28 jours, de 90 jours (étude subchronique) ou d'une année ou plus (étude chronique). Les procédures décrites dans cette méthode peuvent également être appliquées dans le cas d'une étude de neurotoxicité aiguë. Les animaux sont soumis à l'essai afin de détecter ou de caractériser des anomalies de comportement ou d'ordre neurologique. Au cours de chaque période d'observation, différents aspects du comportement qui pourraient être indicatifs d'une atteinte neurotoxique sont évalués. À la fin de l'essai, une partie des animaux de chaque groupe et de chaque sexe sont perfusés in situ et des coupes du cerveau, de la moelle épinière et des nerfs périphériques sont préparées et examinées.

Lorsque l'étude est conduite de façon indépendante pour dépister une neurotoxicité ou caractériser des effets neurotoxiques, les animaux de chaque groupe qui ne sont pas utilisés pour la perfusion et l'examen histopathologique (voir tableau 1) peuvent servir pour des examens du comportement et des examens neuropathologiques, neurochimiques ou électrophysiologiques qui permettent de compléter les données recueillies dans les observations de base préconisées par la présente méthode (1). Ces examens complémentaires peuvent être particulièrement utiles lorsque des observations empiriques ou des effets escomptés laissent prévoir un type spécifique de neurotoxicité ou une cible spécifique pour cette neurotoxicité. Une autre possibilité est d'utiliser les animaux restants dans des évaluations telles que celles qui sont préconisées par les méthodes d'essai de toxicité à doses répétées chez les rongeurs.

▼B

Lorsque les procédures de la présente méthode d'essai sont combinées avec celles d'autres méthodes, il faut prévoir un nombre suffisant d'animaux pour pouvoir effectuer les observations requises par les deux études.

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. **Choix de l'espèce animale**

Le rat est l'espèce préférée, mais d'autres espèces de rongeurs peuvent être utilisées moyennant justification du choix. Il convient de recourir aux souches couramment utilisées en laboratoire. Les animaux doivent être adultes, jeunes et sains. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. L'administration des doses doit débuter aussitôt après le sevrage, de préférence avant que les animaux n'atteignent l'âge de six semaines et en tout état de cause avant neuf semaines. Cependant, lorsque la présente étude est couplée à d'autres études, cette limite d'âge peut faire l'objet d'un ajustement. Au début de l'étude, les variations de poids entre animaux ne doivent pas dépasser plus ou moins 20 % du poids moyen des animaux du même sexe. Si une étude de toxicité orale à dose répétée de faible durée est réalisée en tant qu'essai préliminaire avant une étude à long terme, il faut utiliser des animaux de même souche et de même provenance dans les deux études.

1.4.2. **Conditions d'hébergement et d'alimentation**

La température du local des animaux d'expérience doit être de 22 ^{o}C (± 3 ^{o}C). L'humidité relative doit atteindre au moins 30 % et rester de préférence inférieure à 70 %, mais en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 %. On appliquera un éclairage artificiel alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les bruits forts intermittents doivent être réduits au minimum. Pour l'alimentation des animaux, on pourra utiliser la nourriture classique de laboratoire avec de l'eau potable à satiété. Le choix du régime peut être influencé par la nécessité d'assurer un mélange convenable de la substance d'essai lorsqu'elle est administrée dans la nourriture. Les animaux peuvent être placés dans des cages soit individuellement, soit par petits groupes du même sexe.

1.4.3. **Préparation des animaux**

Des animaux jeunes et sains sont choisis au hasard pour être répartis entre les groupes de contrôle et de traitement. Les cages sont disposées de manière à minimiser les effets possibles dus à l'agencement des cages. Les animaux sont marqués individuellement afin de permettre leur identification. Ils sont maintenus dans les cages pendant cinq jours au moins avant le début de l'étude pour leur permettre de s'acclimater aux conditions du laboratoire.

1.4.4. **Voies d'administration et préparation des doses**

Dans cette méthode, la substance d'essai est administrée par voie orale. La substance à tester peut être administrée par gavage ou en capsules ou incorporée dans la nourriture ou l'eau de boisson. D'autres voies d'administration (par exemple voie dermique ou inhalation) peuvent être utilisées, mais nécessiteront le cas échéant des modifications du mode opératoire. Le choix de la voie d'administration est dicté par les circonstances de l'exposition humaine et par les informations toxicologiques ou cinétiques disponibles. Le choix de la voie d'administration ainsi que les éventuelles modifications du mode opératoire doivent être justifiés.

▼B

Si nécessaire, la substance d'essai peut être dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Il est recommandé de privilégier les solutions ou suspensions aqueuses. À défaut, on peut utiliser une solution dans l'huile (huile de maïs, par exemple) et, en dernier recours, une solution dans d'autres véhicules. Lorsque le véhicule n'est pas aqueux, il faut en connaître les propriétés toxiques. D'autres caractéristiques du véhicule peuvent avoir de l'importance, notamment des éventuels effets sur l'absorption, la distribution, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai, pouvant agir sur les propriétés toxiques de celle-ci, et des effets sur la consommation de nourriture ou d'eau ou sur l'état nutritionnel des animaux.

1.5. MODE OPÉRATOIRE

1.5.1. **Nombre et sexe des animaux**

Lorsqu'il s'agit d'une étude indépendante, il faut utiliser au moins vingt animaux (dix femelles et dix mâles) dans chaque groupe de traitement et dans chaque groupe témoin pour les observations cliniques et fonctionnelles. À la fin de l'étude, au moins cinq mâles et cinq femelles sont prélevés parmi ces dix mâles et ces dix femelles pour être perfusés in situ et soumis à un examen neurohistopathologique. Lorsque dans un groupe de dosage, les observations visant à détecter les effets neurotoxiques ne sont réalisées que sur un nombre limité d'animaux, il convient que ces animaux fassent partie de ceux qui seront choisis pour être perfusés. Si l'étude est combinée avec une étude de toxicité à doses répétées, le nombre des animaux doit être suffisant pour que les objectifs des deux études puissent être atteints. Le tableau 1 donne les nombres minimaux d'animaux par groupe pour différentes combinaisons d'études. S'il est prévu de sacrifier des animaux avant le terme de l'étude ou de constituer des groupes pour observer la réversibilité des effets, leur persistance ou l'apparition différée d'effets toxiques après traitement, ou si des observations complémentaires sont envisagées, il faut augmenter le nombre d'animaux pour s'assurer que le nombre requis pour les observations et les examens histopathologiques sera disponible.

1.5.2. **Groupes de traitement et groupes témoins**

En règle générale, on doit disposer d'au moins trois groupes d'animaux traités et d'un groupe témoin. Cependant, s'il ressort de l'évaluation d'autres données qu'aucun effet n'est à attendre d'une administration répétée à la dose de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, on peut procéder à un essai limite. Si l'on ne dispose pas de données adéquates, on peut mener une étude préliminaire visant à délimiter la gamme des niveaux de doses à utiliser. À l'exception de l'exposition à la substance à tester, les animaux du groupe témoin doivent être traités exactement de la même manière que les animaux des groupes de traitement. Si la substance à tester est incorporée dans un véhicule, le groupe témoin doit en recevoir un volume égal au plus grand volume utilisé dans les groupes de traitement.

1.5.3. **Contrôle de la fiabilité**

Le laboratoire chargé de l'étude doit présenter des données attestant de sa capacité à réaliser l'étude et prouvant la sensibilité des méthodes employées. Ces données doivent constituer une preuve évidente de la faculté du laboratoire à détecter et, le cas échéant, à quantifier les changements observés pour les différents critères d'évaluation, notamment réactions neurovégétatives, réactivité sensorielle, force de préhension et activité motrice. Les références 2 à 9 contiennent des informations sur les substances qui provoquent différents types de réponses neurotoxiques et qui peuvent servir de témoins positifs. Des données antérieures peuvent également être utilisées à condition que les principaux éléments des procédures expérimentales soient restés les mêmes. Des mises à jour périodiques de ce type de données sont recommandées. Chaque fois que le laboratoire modifie un élément essentiel du mode opératoire ou des méthodes employées, de nouvelles données doivent être réunies pour démontrer que la sensibilité des procédures est maintenue.

▼B

1.5.4. **Choix des doses**

Les niveaux de dose doivent être choisis en fonction des données disponibles concernant la toxicité et la toxico-cinétique de la substance d'essai ou de substances apparentées. La dose la plus élevée est choisie dans le but de provoquer des effets neurotoxiques ou des effets de toxicité systémique manifeste. Il faut ensuite choisir une série de doses décroissantes de façon à mettre en évidence une éventuelle relation dose-effet et l'absence d'effets nocifs observables au niveau de la dose la plus faible (CSENO). En principe, les niveaux de doses doivent être choisis de telle manière que l'on puisse distinguer les effets neurotoxiques primaires des effets liés à la toxicité systémique. Deux à trois intervalles entre niveaux successifs représentent fréquemment la meilleure solution et il est souvent préférable d'ajouter un quatrième groupe d'essai plutôt que de fixer des intervalles trop espacés (par exemple dépassant un facteur dix) entre les niveaux de dose. Lorsque des estimations réalistes de l'exposition humaine existent, il faut en tenir compte.

1.5.5. **Essai limite**

Si une étude réalisée à une dose d'au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour selon la méthode décrite ci-dessus ne provoque aucun effet toxique observable, et que d'après les données obtenues pour des composés de structure analogue il est peu probable que la substance testée soit toxique, on peut considérer qu'il est inutile d'effectuer une étude complète sur trois niveaux de dose. En fonction de l'exposition humaine escomptée, il pourra s'avérer nécessaire d'administrer une dose plus forte par voie orale pour l'essai limite. Pour les autres voies d'administration, comme l'inhalation ou l'application cutanée, ce sont souvent les propriétés physiques et chimiques de la substance qui déterminent le niveau d'exposition maximal. Dans le cas d'une étude orale aiguë, la dose de l'essai limite doit être au moins 2 000 mg/kg.

1.5.6. **Administration des doses**

La substance à tester est administrée aux animaux quotidiennement, sept jours par semaine, sur une période d'au moins 28 jours. L'administration à raison de cinq jours par semaine ou l'adoption d'une période d'exposition plus courte demandent à être justifiées. Lorsque la substance est administrée par gavage, les animaux doivent recevoir une dose unique introduite au moyen d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel. Toutefois, dans le cas d'une solution aqueuse, il est possible d'utiliser jusqu'à 2 ml/100 g de poids corporel. Exception faite pour les substances irritantes ou corrosives, qui donneraient normalement lieu à des effets fortement amplifiés à des concentrations plus élevées, il convient de minimiser les variations du volume administré en ajustant la concentration de façon à maintenir un volume constant à tous les niveaux de dose.

Lorsque la substance est administrée dans la nourriture ou l'eau de boisson, il importe que les quantités de substance utilisées ne modifient pas les bilans nutritionnels ou hydriques normaux. Lorsque la substance est administrée dans la nourriture, deux possibilités sont offertes: soit le maintien d'une concentration constante (exprimée en ppm), soit le maintien d'un niveau de dose constant par rapport au poids corporel de l'animal. L'option choisie doit être précisée. Lorsque la substance est administrée par gavage, la dose doit être administrée chaque jour à la même heure et la quantité doit être ajustée de manière à maintenir un niveau de dose constant par rapport au poids corporel de l'animal. Lorsqu'un essai à dose répétée sert d'étude préliminaire à une étude à long terme, il faut appliquer le même régime alimentaire dans les deux études. Pour les études de toxicité aiguë, si la dose ne peut être administrée en une seule fois, il est possible de la fractionner sur période n'excédant pas 24 heures.

▼B

1.6. OBSERVATIONS

1.6.1. **Fréquence des observations et essais**

Dans les études à doses répétées la période d'observation doit s'étendre sur toute la période de traitement. Dans les études de toxicité aiguë, les observations sont poursuivies pendant 14 jours après le traitement. Les animaux de groupes satellites (qui ne sont pas exposés pendant une certaine période après le traitement) sont observés également pendant 14 jours.

Les observations doivent être suffisamment fréquentes pour favoriser la détection de toute anomalie de comportement ou d'ordre neurologique. Les observations se font de préférence aux mêmes moments chaque jour, en tenant compte de la période au cours de laquelle les effets escomptés du traitement seront les plus marqués. Le tableau 2 récapitule la fréquence des observations cliniques et des tests fonctionnels. Si des données de cinétique et autres, obtenues dans des études antérieures, indiquent que d'autres moments de la journée sont plus propices aux observations, essais ou observations après traitement, il y a lieu d'adopter un échéancier différent afin de recueillir le plus d'informations possible. Les modifications de l'échéancier doivent être justifiées.

1.6.1.1. *Surveillance de l'état de santé général et relevés de mortalité/morbidité*

Tous les animaux font l'objet d'un examen minutieux au moins une fois par jour pour vérifier leur état de santé, et des relevés de la morbidité et de la mortalité sont effectués au moins deux fois par jour.

1.6.1.2. *Observations cliniques détaillées*

Tous les animaux choisis pour être soumis à un examen clinique approfondi (voir tableau 1) subissent cet examen une fois avant la première exposition (pour permettre des comparaisons sur un même individu) et à divers intervalles par la suite, en fonction de la durée de l'étude (voir tableau 2). Les groupes satellites destinés à l'observation de la réversibilité des effets sont examinés à la fin de la période de récupération. Ces examens doivent être effectués hors de la cage habituelle, sur une aire standard. Les résultats doivent être soigneusement consignés, de préférence à l'aide de systèmes de cotation utilisant des critères ou d'échelles de cotation, pour chaque mesure effectuée. Les critères ou échelles employés doivent être explicitement définis par le laboratoire. Il faut s'efforcer de minimiser les variations des conditions d'essai (mis à part celles qui sont liées au traitement) et prendre les dispositions nécessaires pour que les examens soient effectués par des observateurs expérimentés n'ayant pas connaissance du traitement administré.

Il est recommandé de procéder de manière structurée en appliquant systématiquement, pour chaque animal et à chaque moment d'observation, des critères bien définis. Les données utilisées pour définir le niveau normal doivent être présentées. Tous les signes observés doivent être consignés. L'ampleur des signes observés est également consignée chaque fois que cela est possible. Les observations cliniques devraient notamment porter sur les modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux, des membranes muqueuses, l'apparition de sécrétions et d'excrétions et de réactions neurovégétatives (sécrétion de larmes, horripilation, variation du diamètre pupillaire, rythme respiratoire inhabituel, respiration par la bouche, tous signes inhabituels de miction ou défécation, urine décolorée, par exemple).

▼B

Il convient également de consigner toute réaction inhabituelle en ce qui concerne la position du corps, le niveau d'activité (par exemple exploration accrue ou diminuée de l'aire standard) et la coordination des mouvements. Il convient également de consigner les modifications dans la démarche (dandinement, ataxie, par exemple), dans la posture (dos arrondi, par exemple) et la réaction à la manipulation, au placement et autres stimuli, ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, les convulsions et tremblements, les comportements stéréotypés (par exemple, toilettage excessif, parcours circulaires répétitifs) ou les comportements bizarres (par exemple, tendance à mordre, léchage excessif, automutilation, marche à reculons, vocalisation) ou l'agressivité.

1.6.1.3. *Tests fonctionnels*

Comme dans le cas des observations cliniques, les tests fonctionnels sont réalisés sur tous les animaux sélectionnés à cet effet (voir tableau 1) une fois avant l'exposition et fréquemment ensuite. La fréquence des tests fonctionnels dépend également de la durée de l'étude (voir tableau 2). En plus des périodes d'observation stipulées dans le tableau 2, des observations fonctionnelles sont réalisées sur des groupes satellites aussi près que possible du sacrifice final. Les tests fonctionnels explorent notamment la réactivité sensorielle à divers stimuli [par exemple, stimuli auditifs, visuels et proprioceptifs (5) (6) (7)], la force de préhension (8) et l'activité motrice (9). Cette dernière doit être mesurée à l'aide d'un dispositif automatique pouvant détecter aussi bien les hausses que les baisses d'activité. Si un autre système défini est utilisé, il doit être quantitatif et de sensibilité et de fiabilité démontrées. Chaque dispositif doit être testé afin de garantir sa fiabilité au cours du temps et la cohérence des résultats d'un dispositif à l'autre. On trouvera dans les références bibliographiques susmentionnées une description plus détaillée des modes opératoires. En l'absence d'informations sur le potentiel neurotoxique (par exemple, informations sur la relation structure-activité, données épidémiologiques, autres études toxicologiques), il convient d'envisager des tests plus spécialisés d'exploration des fonctions sensorielles et motrices ou de la mémoire et de la faculté d'apprentissage. La référence (1) fournit de plus amples informations sur les tests plus spécialisés et leur utilisation.

Exceptionnellement, les animaux qui montrent des signes de toxicité marqués qui risqueraient de fausser considérablement les résultats du test fonctionnel peuvent ne pas être soumis à ce test. La décision d'écarter des animaux d'un test fonctionnel doit être justifiée.

1.6.2. **Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau**

Dans les études allant jusqu'à 90 jours, tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine. Il faut également mesurer la quantité de nourriture consommée (ou d'eau consommée, lorsque la substance est administrée par cette voie), au moins une fois par semaine. Dans les études à long terme, tous les animaux sont pesés au moins une fois par semaine pendant les treize premières semaines et au moins une fois toutes les quatre semaines par la suite. La quantité de nourriture consommée (ou d'eau, si la substance est administrée par cette voie) doit être mesurée au moins une fois par semaine pendant les treize premières semaines et à peu près tous les trois mois par la suite, à moins qu'une détérioration de l'état général ou un amaigrissement n'imposent d'autres conditions.

▼B

1.6.3. **Ophtalmologie**

Dans les études de plus de 28 jours, un examen ophtalmologique à l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un autre appareil approprié doit être effectué avant l'administration de la substance et au terme de l'étude. Cet examen est effectué de préférence sur tous les animaux et en tout état de cause au moins sur ceux du groupe ayant reçu la dose la plus forte ainsi que sur les animaux des groupes témoins. Si des altérations sont détectées dans les yeux, ou si des signes cliniques y incitent, l'examen est étendu à tous les animaux. Dans les études à long terme, un examen ophtalmologique est prévu après treize semaines. Des examens ophtalmologiques ne sont pas nécessaires si les informations pertinentes ont déjà été fournies par d'autres études de durée similaire réalisées à des doses comparables.

1.6.4. **Hématologie et biochimie clinique**

Lorsque l'étude de neurotoxicité est conduite en combinaison avec une étude de toxicité systémique à doses répétées, les examens hématologiques et les déterminations de biochimie clinique doivent être effectués comme prescrit par la méthode correspondante de l'étude de toxicité systémique. Les échantillons sont à prélever de telle façon que les effets possibles sur le comportement neurologique soient réduits au minimum.

1.6.5. **Histopathologie**

L'examen neuropathologique doit être conçu dans le but de compléter et d'approfondir les observations faites pendant la phase in vivo de l'étude. Les tissus d'au moins cinq animaux de chaque sexe et de chaque groupe (voir le tableau 1 et le paragraphe suivant) doivent être fixés in situ à l'aide des techniques de perfusion et de fixation usuelles (voir le chapitre 5 de la référence 3 et le chapitre 50 de la référence 4). Tout changement important observable doit être consigné. S'il s'agit d'une étude indépendante, réalisée pour dépister une neurotoxicité ou pour caractériser des effets neurotoxiques, les animaux restants peuvent être utilisés pour des examens spécifiques du comportement neurologique (10) (11), des examens neuropathologiques (10) (11) (12) (13), neurochimiques (10) (11) (14) (15) ou électrophysiologiques (10) (11) (16) (17) pouvant éventuellement compléter les procédures et examens décrits ici, ou bien venir s'ajouter aux animaux soumis à l'examen histopathologique. Ces procédures complémentaires sont particulièrement utiles lorsque, à la suite d'observations empiriques ou sur la base des effets escomptés, on peut s'attendre à un type spécifique de neurotoxicité ou à une cible spécifique de celle-ci (2) (3). Ces animaux restants peuvent également servir dans les évaluations pathologiques de routine qui sont décrites dans la méthode à doses répétées.

Les échantillons de tissus sont colorés par une méthode usuelle, par exemple par de l'hématoxyline et de l'éosine, inclus dans de la paraffine et examinés sous le microscope. Si des signes de neuropathie périphérique sont observés ou en cas de suspicion de tels effets, il conviendra d'examiner des échantillons de tissu nerveux périphérique inclus dans du plastique. Certains signes cliniques peuvent également inciter à l'examen d'autres sites ou à l'utilisation de méthodes de coloration spéciales. Les références (3) et (4) fournissent des indications sur les sites supplémentaires à examiner. Des colorants spéciaux peuvent aussi être utiles pour mettre en évidence des types spécifiques d'altérations pathologiques (18).

▼B

Un examen histologique doit être réalisé sur des coupes représentatives du système nerveux central et périphérique (voir le chapitre 5 de la référence 3 et le chapitre 50 de la référence 4). Les sites examinés doivent normalement comprendre le cerveau antérieur, le centre des hémisphères cérébraux, comprenant une coupe de l'hippocampe, le cerveau central, le cervelet, la protubérance annulaire, le bulbe rachidien, l'œil avec le nerf optique et la rétine, la moelle épinière et les renflements cervicaux et lombaires, les ganglions de la chaîne dorsale, les fibres de la chaîne dorsale et ventrale, le nerf sciatique proximal, le nerf tibial proximal (au genou) et les ramifications du nerf tibial aux muscles du mollet. Les sections de la moelle épinière et des nerfs périphériques doivent comprendre des coupes transversales et longitudinales. Il faut accorder une attention particulière à la vascularisation du système nerveux. Un échantillon de muscles squelettiques, en particulier du mollet, devrait également être examiné. Une attention particulière devrait être accordée aux régions à structure cellulaire et fibreuse du système nerveux central et périphérique, qui sont connues pour être particulièrement sujettes aux attaques neurotoxiques.

Les références (3) et (4) fournissent des informations sur les altérations neuropathologiques typiquement liées aux expositions à une substance neurotoxique. Il est recommandé de procéder par étapes pour l'examen des échantillons de tissus, en comparant d'abord des coupes du groupe ayant reçu la forte dose avec des coupes du groupe témoin. Si aucune altération neuropathologique n'est constatée dans les échantillons de ces groupes, il n'est pas nécessaire de poursuivre l'analyse. Si des altérations neuropathologiques apparaissent dans le groupe traité à la forte dose, il faut alors examiner successivement des échantillons de tous les tissus potentiellement affectés des groupes traités à la dose intermédiaire et à la dose faible.

Si l'examen qualitatif met en évidence des signes d'altérations neuropathologiques, il convient de procéder à un second examen de toutes les régions du système nerveux qui présentent ces altérations. Dans tous les groupes de dosage, il convient de réaliser des coupes de toutes les régions potentiellement affectées, qui seront ensuite codées, puis examinées à l'aveugle dans un ordre aléatoire. La fréquence et la gravité de chaque lésion sont consignées. Quand toutes les régions de tous les groupes ont été cotées, le code est cassé et une analyse statistique est faite afin de déterminer la relation dose-réponse. Il faut donner la description des différents degrés de gravité de chaque lésion.

Les résultats de l'examen neuropathologique doivent être évalués à la lumière des observations et déterminations fonctionnelles, ainsi que des résultats des études de toxicité systémique réalisées sur la substance.

2. RÉSULTATS

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Il faut présenter les résultats relatifs à chaque individu. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux montrant pour chaque groupe d'essai ou groupe témoin le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts ou euthanasiés au cours de l'essai, le moment de chaque décès ou sacrifice, le nombre d'animaux manifestant des signes de toxicité, une description de ces signes, y compris le moment de leur apparition, leur durée, leur type et leur gravité, le nombre d'animaux présentant des lésions, le type de ces dernières et leur gravité.

▼B

2.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats de l'étude doivent être évalués sur les plans de la fréquence, de la gravité et de la corrélation des effets neuropathologiques et de comportement (le cas échéant, neurochimiques et électrophysiologiques si des examens supplémentaires ont été pratiqués) avec d'autres effets nocifs observés. Dans la mesure du possible, les résultats numériques devraient être évalués au moyen d'une méthode statistique adéquate et communément acceptée. Les méthodes statistiques doivent être choisies au moment de la conception de l'étude.

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit comporter les informations ci-après:

Substance d'essai:

— nature physique (y compris isomérisation, pureté et propriétés physico-chimiques),

— données permettant l'identification.

Véhicule (le cas échéant):

— justification du choix du véhicule.

Animaux d'expérience:

— espèce/souche utilisée,

— nombre, âge et sexe des animaux,

— source, conditions d'encagement, acclimatation, alimentation, etc.,

— source, conditions d'encagement, acclimatation, alimentation, etc.

Conditions de l'essai:

— description détaillée de la formulation de la substance à tester et/ou de la préparation alimentaire, concentration atteinte, stabilité et homogénéité de la préparation,

— précisions sur les doses administrées, le véhicule, le volume et la forme physique du mélange administré,

— précisions sur le mode d'administration de la substance à tester,

— justification du choix des niveaux de dose,

— justification du choix de la voie et de! a durée d'exposition,

— conversion de la concentration (en ppm) de la substance à tester dans la nourriture ou dans l'eau de boisson en dose (en mg/kg de poids corporel/jour), le cas échéant,

— précisions sur la qualité des aliments et de l'eau.

Procédures d'observation et d'essais:

— précisions sur l'affectation des animaux de chaque groupe aux sous-groupes de perfusion,

— précisions sur les systèmes de cotation, les critères et les échelles utilisés pour chaque détermination lors des observations cliniques détaillées,

▼B

— précisions sur les tests fonctionnels d'exploration de la réactivité sensorielle à divers stimuli (par exemple stimuli auditifs, visuels et proprioceptifs); précisions sur l'évaluation de la force de préhension; précisions sur l'évaluation de l'activité motrice (y compris détails sur les dispositifs automatiques de détection de l'activité) et sur les autres procédures,

— précisions sur les examens ophtalmologiques et, le cas échéant, hématologiques et sur les tests de biochimie clinique, avec indication des valeurs de référence,

— précisions sur les procédures spécifiques de recherche des modifications du comportement et des altérations neuropathologiques, neurochimiques et électrophysiologiques.

Résultats:

— poids corporel/variations du poids corporel et poids au moment du sacrifice,

— consommation d'aliments et d'eau, le cas échéant,

— informations sur les réactions de toxicité, par sexe et par niveau de dose, y compris les symptômes de toxicité ou mortalité,

— nature, gravité et durée (moment du début et évolution observée) des observations cliniques détaillées (préciser si les effets sont réversibles ou non),

— description détaillée des résultats de tous les tests fonctionnels,

— résultats de l'autopsie,

— description détaillée de toutes les observations concernant le comportement, les modifications neuropathologiques, neurochimiques et électrophysiologiques, le cas échéant,

— données concernant l'absorption et le métabolisme, si disponibles,

— traitement statistique des résultats, le cas échéant.

Discussion des résultats:

— informations concernant la relation dose-réponse,

— rapport entre tout autre effet toxique et une conclusion quant au potentiel neurotoxique de la substance,

— concentration sans effet nocif observé.

Conclusions:

— une appréciation sur la neurotoxicité globale de la substance est demandée.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris In Preparation.

(2) Test Guidline for a Developmental Neurotoxicitu Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.

(3) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria Document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals.

(4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, p. 726-742.

▼B

(5) Tupper D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, p. 999-1003.

(6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, p. 691-704.

(7) Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, p. 267-283.

(8) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, p. 233-236.

(9) Crofton, K.M., Haward, J.L, Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, p. 599-609.

(10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

(11) Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

(12) Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, p. 689-695.

(13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, p. 343-352.

(14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, p. 445-452.

(15) O'Callaghan, J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, p. 368-378.

(16) Fox, D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, p. 299-335.

(17) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in Neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds, Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, p. 726-742.

(18) Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

Tableau 1

Nombres minimaux d'animaux requis par groupe selon que l'étude de neurotoxicité est conduite séparément ou en combinaison avec d'autres études

	ÉTUDE DE NEUROTOXICITÉ CONDUITE COMME:			
	Étude séparée	Étude combinée avec une étude sur 28 jours	Étude combinée avec une étude sur 90 jours	Étude combinée avec une étude de toxicité chronique
Nombre total d'animaux par groupe	10 mâles et 10 femelles	10 mâles et 10 femelles	15 mâles et 15 femelles	25 mâles et 25 femelles
Nombre d'animaux sélectionnés pour les tests fonctionnels, y compris les observations cliniques détaillées	10 mâles et 10 femelles	10 mâles et 10 femelles	10 mâles et 10 femelles	10 mâles et 10 femelles
Nombre d'animaux sélectionnés pour la perfusion in situ et l'examen neurohistopathologique	5 mâles et 5 femelles	5 mâles et 5 femelles	5 mâles et 5 femelles	5 mâles et 5 femelles
Nombre d'animaux sélectionnés pour les essais de toxicité à dose répétée, de toxicité subchronique et chronique, les études hématologiques, de biochimie clinique, histopathologiques, etc., comme indiqué dans les lignes directrices correspondantes		5 mâles et 5 femelles	10 mâles† et 10 femelles†	20 mâles† et 20 femelles†
Observations complémentaires, le cas échéant	5 mâles et 5 femelles			

† Ce nombre comprend cinq animaux sélectionnés pour les tests fonctionnels et les observations cliniques détaillées faisant partie de l'étude de neurotoxicité.

▼B

Tableau 2

Fréquence des observations cliniques et périodicité des tests fonctionnels

Type d'observation		Durée de l'étude			
		Étude de toxicité aiguë	28 jours	90 jours	Étude de toxicité chronique
Sur tous les animaux	État de santé général	quotidiennement	quotidiennement	quotidiennement	quotidiennement
	Mortalité/morbidité	deux fois par jour	deux fois par jour	deux fois par jour	deux fois par jour
Sur les animaux sélectionnés pour les observations fonctionnelles	Observations cliniques détaillées	— avant la première exposition — dans les huit heures suivant l'administration, au moment où l'effet est censé être le plus prononcé — aux jours 7 et 14 après administration	— avant la première exposition — une fois par semaine ensuite	— avant la première exposition — une fois pendant la première ou la deuxième semaine d'exposition — une fois par mois ensuite	— avant la première exposition — une fois à la fin du premier mois d'exposition — tous les trois mois ensuite
	Tests fonctionnels	— avant la première exposition — dans les huit heures suivant l'administration, au moment où l'effet est censé être le plus prononcé — aux jours 7 et 14 après administration	— avant la première exposition — pendant la quatrième semaine du traitement le plus près possible de la fin de la période d'exposition	— avant la première exposition — une fois pendant la première ou la deuxième semaine d'exposition — une fois par mois ensuite	— avant la première exposition — une fois à la fin du premier mois d'exposition — tous les trois mois ensuite

▼B

B.44. **ABSORPTION CUTANÉE: MÉTHODE IN VIVO**

1. **MÉTHODE**

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 427 (2004) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La voie d'exposition à de nombreux produits chimiques est essentiellement transcutanée, c'est-à-dire via la peau. Or, la majorité des études toxicologiques réalisées sur des animaux de laboratoire s'appuient sur une administration des produits par voie orale. L'étude d'absorption cutanée in vivo décrite dans la présente méthode offre donc les éléments nécessaires pour extrapoler les résultats des études par administration orale, lors des évaluations en matière de sécurité réalisées après exposition cutanée.

Avant de passer dans la circulation sanguine, une substance doit d'abord traverser un grand nombre de couches cellulaires de la peau. Pour la plupart des substances, c'est le stratum corneum, composé de cellules mortes, qui est la couche déterminante sur le plan cinétique. La perméabilité de la peau dépend à la fois de la lipophilicité de la substance et de l'épaisseur de la couche externe de l'épiderme, ainsi que d'autres facteurs tels que le poids moléculaire et la concentration de la substance. De manière générale, la peau des rats et des lapins est plus perméable que celle de l'homme, tandis que celle des cobayes, des porcs et des singes se rapproche de la peau humaine.

Les méthodes de mesure de l'absorption percutanée sont de deux types: in vivo et in vitro. La méthode in vivo fournit de bonnes informations sur l'absorption cutanée chez différentes espèces de laboratoire. Mises au point plus récemment, les méthodes in vitro se fondent sur le transport d'une substance à travers tout ou partie de l'épaisseur de la peau humaine ou animale jusqu'à un réservoir de fluide. La méthode in vitro est décrite dans une autre méthode d'essai (1). Pour choisir la méthode la mieux appropriée en fonction des situations données, il est recommandé de consulter le document d'orientation de l'OCDE pour la conduite des études d'absorption cutanée (2) qui examine en détails la pertinence respective des méthodes in vivo et in vitro.

La méthode *in vivo* décrite dans la présente méthode permet de déterminer que la substance d'essai a traversé la peau pour pénétrer dans le compartiment systémique. La technique est largement utilisée depuis de nombreuses années (3) (4) (5) (6) (7). Alors que les études in vitro d'absorption percutanée conviennent dans de nombreux cas, il existe certaines situations dans lesquelles seule une étude in vivo permet d'obtenir les données voulues.

Les avantages de la méthode *in vivo* sont les suivants: utilisation d'un système intact sur les plans physiologique et métabolique, utilisation d'une espèce commune à bon nombre d'études de toxicité, et possibilité de modification pour une utilisation sur d'autres espèces. En revanche, elle présente certains inconvénients: utilisation d'animaux vivants, utilisation de matière radiomarquée pour garantir la fiabilité des résultats, difficultés à déterminer la phase d'absorption précoce, et différences de perméabilité entre la peau humaine et celle des espèces les plus communément utilisées (rat). En effet, la peau animale est généralement plus perméable, ce qui peut conduire à une surestimation de l'absorption percutanée chez l'homme (6) (8) (9). Les substances caustiques et corrosives ne doivent pas être testées sur des animaux vivants.

▼B

1.2. DÉFINITIONS

Dose non absorbée: désigne la quantité de substance éliminée par le nettoyage de la surface de la peau après exposition, et toute quantité présente sur le pansement non occlusif, y compris toute quantité volatilisée au cours de l'exposition.

Dose absorbée (in vivo): désigne les quantités de substance présentes dans l'urine, les résidus ramassés dans la cage après nettoyage, les fèces, l'air expiré (s'il est mesuré), le sang, les tissus (s'ils sont collectés) et la carcasse, après récupération de la peau du site d'application.

Dose absorbable: désigne la quantité de substance présente sur ou dans la peau après nettoyage.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance d'essai, de préférence radiomarquée, est appliquée sur la peau rasée des animaux, à la dose ou aux différentes doses appropriée(s), sous la forme d'une préparation d'usage représentative. La préparation d'essai est maintenue au contact de la peau pendant une période donnée, sous un pansement adapté (non occlusif, semi-occlusif ou occlusif) de façon à prévenir l'ingestion de la préparation. Au terme de la période d'exposition, le pansement est retiré et la peau est nettoyée à l'aide d'un agent lavant approprié. Le pansement et le matériel utilisé pour appliquer l'agent lavant sont conservés pour analyse, et un nouveau pansement est appliqué. Avant, pendant et après la période d'exposition, les animaux sont hébergés dans des cages métaboliques individuelles, et les excrétions et l'air expiré au cours de ces périodes sont collectés pour analyse. Le cas échéant, si l'on dispose d'informations suffisantes confirmant l'absence ou la formation limitée de métabolites radioactifs volatils, la collecte de l'air expiré peut être omise. Normalement, chaque étude porte sur plusieurs groupes d'animaux exposés à la préparation d'essai. Un groupe est euthanasié à la fin de la période d'exposition, et les autres groupes sont euthanasiés par la suite à des intervalles déterminés (2). À la fin de la période d'échantillonnage, les animaux restants sont euthanasiés, le sang est collecté pour analyse, la zone d'application est prélevée pour analyse, et la carcasse est analysée pour rechercher toute matière non excrétée. Les échantillons sont analysés selon les méthodes appropriées et on estime le degré d'absorption percutanée (6) (8) (9).

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. **Sélection de l'espèce animale**

Le rat est l'espèce la plus communément utilisée, mais des souches et espèces sans poils présentant un taux d'absorption cutanée plus proche de celui de l'homme peuvent aussi être utilisées (3) (6) (7) (8) (9). Des jeunes adultes sains du même sexe (mâles par défaut) d'une souche communément utilisée en laboratoire sont utilisés. Au début de l'étude, les animaux retenus ne doivent pas présenter un écart de poids de ± 20 % par rapport au poids moyen. Par exemple, des rats mâles de 200 à 250 grammes conviennent tout à fait, en particulier ceux présentant un poids dans la moitié supérieure de cette plage.

▼B

1.4.2. **Nombre et sexe des animaux**

Un groupe d'au moins quatre animaux du même sexe doit être utilisé pour chaque préparation d'essai et chaque durée programmée. Chacun des groupes est euthanasié à un intervalle de temps différent, par exemple à la fin de la période d'exposition (généralement de 6 à 24 heures) et à différentes échéances suivantes (48 et 72 heures par exemple). Dans le cas où des données disponibles démontrent une différence importante de sensibilité toxicologique dermique entre les mâles et les femelles, c'est le sexe le plus sensible qu'il convient d'utiliser. En l'absence de telles données, l'un ou l'autre des sexes peut être utilisé.

1.4.3. **Conditions d'hébergement et d'alimentation**

La température du local expérimental doit être de 22 °C (± 3 °C). Si l'humidité relative doit atteindre au moins 30 % sans excéder de préférence 70 %, en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforce de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 %. On applique un éclairage artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les animaux sont nourris avec un mélange classique pour animaux de laboratoire disponible à volonté et boivent de l'eau potable à volonté. Pendant l'étude, et de préférence également pendant la phase d'acclimatation, les animaux sont placés dans des cages métaboliques individuelles. Les déversements d'eau ou de nourriture étant susceptibles de compromettre les résultats de l'étude, les risques de tels incidents doivent être minimisés.

1.4.4. **Préparation des animaux**

Les animaux sont marqués pour permettre une identification individuelle, et placés dans leurs cages cinq jours au moins avant le début de l'essai, pour qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire.

À l'issue de la période d'acclimatation et 24 heures environ avant l'application de la substance d'essai, la région dorsale des épaules de chaque animal est tondue à ras. La perméabilité d'une peau endommagée étant différente de celle d'une peau saine, un soin tout particulier doit être apporté pour ne pas «égratigner» la peau. Après la tonte et 24 heures environ avant l'application de la substance d'essai sur la peau (voir point 1.4.7), la surface de la peau est délicatement nettoyée à l'acétone pour retirer le sébum. Il n'est pas recommandé de procéder à un nettoyage supplémentaire à l'eau et au savon dans la mesure où les résidus de savon sont susceptibles de favoriser l'absorption de la substance d'essai. La surface tondue doit être suffisamment grande pour permettre un calcul fiable de la quantité de substance d'essai absorbée par centimètre carré de peau, soit de préférence au moins 10 centimètres carrés. Des rats de 200 à 250 grammes sont compatibles avec une telle surface. Après préparation, les animaux sont replacés dans leurs cages métaboliques.

1.4.5. **Substance d'essai**

La substance d'essai est le produit dont on étudie les caractéristiques de pénétration. Dans l'idéal, cette substance d'essai doit être radiomarquée.

1.4.6. **Préparation de l'essai**

La préparation de la substance d'essai (c'est-à-dire la préparation pure, diluée ou le mélange contenant la substance d'essai à appliquer sur la peau) doit être identique (ou représenter un substitut réaliste) aux produits auxquels peuvent être exposés l'homme ou les autres espèces cibles. Toute modification par rapport à la préparation «d'usage» doit être justifiée. Le cas échéant, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule adapté. Lorsqu'un véhicule autre que l'eau est utilisé, ses caractéristiques d'absorption et son interaction potentielle avec la substance d'essai doivent être connues.

▼B

1.4.7. **Application sur la peau**

Une zone (site) d'application d'une superficie spécifique est définie sur la surface de la peau. Une quantité connue de la préparation d'essai est ensuite uniformément appliquée sur ce site. Normalement, cette quantité doit correspondre à une exposition humaine potentielle, soit généralement 1 à 5 mg/cm^2 pour une substance solide ou jusqu'à 10 ml/cm^2 pour les liquides. L'application de toute autre quantité doit être justifiée par les conditions d'utilisation attendues, les objectifs fixés pour l'étude, ou les caractéristiques physiques de la préparation d'essai. Après l'application, le site doit être protégé contre les frottements. La figure 1 présente un exemple de dispositif classiquement employé dans ce contexte. Généralement, on protège le site d'application par un pansement non occlusif (par exemple une compresse de gaze nylon perméable). Cela étant, pour des applications infinies, le site d'application doit être recouvert d'un pansement occlusif. Dans les cas où l'évaporation d'une substance d'essai semi-volatile réduit dans une trop grande mesure le taux de récupération de la substance d'essai (voir également le point 1.4.10, premier paragraphe), il convient de piéger la substance évaporée dans un filtre à charbon monté sur le dispositif d'application (voir la figure 1). Il est essentiel que les dispositifs d'application utilisés n'endommagent pas la peau, et qu'ils n'absorbent pas non plus la préparation d'essai ni n'entrent en réaction avec elle. Les animaux sont ensuite replacés dans leurs cages métaboliques individuelles pour la collecte de leurs excrétions.

1.4.8. **Durée de l'exposition et échantillonnage**

La durée de l'exposition correspond à l'intervalle de temps entre l'application de la préparation d'essai et son retrait par nettoyage de la peau. Une période d'exposition pertinente (généralement de 6 à 24 heures) doit être retenue, en fonction de la durée éventuelle de l'exposition humaine. À l'issue de la période d'exposition, les animaux sont maintenus dans leurs cages métaboliques jusqu'au terme prévu. Pendant toute la durée de l'étude, il convient d'observer les animaux à intervalles réguliers, pour détecter tout signe de toxicité ou toute réaction anormale. Après la période d'exposition, les éventuels signes visibles d'irritation doivent être observés sur la peau traitée.

Les cages métaboliques doivent permettre la collecte séparée des fèces et de l'urine pendant toute la durée de l'étude, ainsi que la collecte du dioxyde de carbone marqué au C_{14} et des composés volatils C_{14} qu'il convient d'analyser lorsqu'ils sont produits en quantité (> 5 %). L'urine, les fèces et autres fluides (par exemple, le dioxyde de carbone C_{14} et les composés volatils C_{l4}) doivent être collectés individuellement pour chaque groupe et à chaque étape d'échantillonnage. Sur la base d'informations suffisantes confirmant l'absence ou la formation limitée de métabolites radioactifs volatils, on peut le cas échéant utiliser des cages ouvertes.

Les excrétions sont collectées pendant la période d'exposition, soit 24 heures maximum après la première application sur la peau, puis ensuite chaque jour jusqu'à la fin de l'expérience. Si trois intervalles de collecte des excrétions suffisent normalement, des points de collecte supplémentaires ou plus appropriés peuvent être définis pour une étude, selon l'objectif envisagé pour la préparation d'essai ou en fonction de données cinétiques existantes.

À la fin de la période d'exposition, le dispositif de protection est retiré de chaque animal et conservé individuellement aux fins d'analyse. La peau traitée de tous les animaux doit être nettoyée au moins trois fois à l'aide d'un agent et de tampons nettoyants appropriés. Un soin particulier doit être apporté de façon à ne pas contaminer d'autres zones du corps des animaux. L'agent lavant doit être représentatif des pratiques d'hygiène normales (par exemple une solution d'eau savonneuse). Enfin, la peau doit être séchée. Tous les tampons et matériel de nettoyage utilisés doivent être conservés pour analyse. Un nouveau pansement doit être appliqué sur le site traité des animaux formant les derniers groupes, avant leur retour dans les cages métaboliques individuelles.

▼B

1.4.9. **Procédures terminales**

Pour chaque groupe, les animaux doivent être euthanasiés à l'échéance préétablie et leur sang collecté pour analyse. Le pansement ou dispositif de protection doit être retiré pour analyse. La peau du site d'application et une surface de peau équivalente mais provenant d'une zone rasée non traitée doivent être prélevées sur chaque animal, et des analyses distinctes doivent être conduites. Le cas échéant, le site d'application peut être fractionné pour séparer le stratum corneum de l'épiderme sous-jacent, de façon à fournir des informations supplémentaires sur l'évacuation et le comportement de la substance chimique d'essai. En effet, déterminer le comportement/élimination du produit au cours d'un laps de temps donné après la période d'exposition donne une indication sur le devenir de n'importe quelle substance chimique dans le stratum corneum. Pour faciliter le fractionnement de la peau (après le dernier nettoyage et l'euthanasie des animaux), il faut d'abord retirer tous les dispositifs de protection. Ensuite, on prélève la peau du site d'application sur le rat, plus une bande circulaire autour du site, puis on épingle le tout sur une planche. On applique alors, par quelques pressions légères, une bande de ruban adhésif à la surface de la peau. Cette bande est ensuite retirée, avec une partie du stratum corneum. On renouvelle l'opération jusqu'à ce que la bande n'adhère plus à la surface de la peau, lorsque tout le stratum corneum a été retiré. Pour chaque animal, on peut combiner toutes les bandes d'adhésif dans un seul récipient, dans lequel on ajoute un digestif pour solubiliser le stratum corneum. Le cas échéant, on récupère tout éventuel tissu cible pour procéder à des mesures séparées, avant analyse de la carcasse résiduelle et mesure de la dose absorbée par celle-ci. Les carcasses des animaux doivent être conservées pour analyse. En règle générale, l'analyse du contenu total de la carcasse est suffisante, mais certains organes peuvent être retirés pour des analyses séparées (par exemple si cela est indiqué par d'autres études). L'urine présente dans la vessie au moment de l'euthanasie doit être ajoutée à celle collectée auparavant. Après collecte des excrétions dans les cages métaboliques au moment de l'euthanasie, les cages et leurs trappes doivent être nettoyées avec un solvant approprié. Les autres équipements potentiellement contaminés doivent également être analysés.

1.4.10. **Analyse**

Dans toutes les études, un niveau de récupération approprié doit être atteint (à savoir une moyenne de 100 ± 10 % de la radioactivité). Les récupérations en dehors de cette plage doivent faire l'objet de justification. Le volume de la dose administrée dans chaque échantillon doit être analysé selon des procédures suffisamment validées.

L'analyse statistique doit inclure une mesure de la variance des essais répétés de chaque application.

2. **RÉSULTATS**

Les mesures suivantes de la substance d'essai et/ou des métabolites doivent être effectuées sur chaque animal et à chaque point d'échantillonnage. Tous les résultats doivent être présentés individuellement, mais aussi groupés par point d'échantillonnage sous forme de moyenne:

— quantité associée aux dispositifs de protection,

— quantité pouvant être récupérée de la peau,

— quantité présente sur ou dans la peau et impossible à retirer par nettoyage,

▼B

— quantité dans les échantillons de sang,

— quantité dans les excrétions et l'air expiré (le cas échéant),

— quantité restant dans la carcasse et tout organe éventuellement retiré pour analyse.

Les quantités de substance d'essai et/ou de métabolites trouvées dans les excrétions, l'air expiré, le sang et la carcasse permettent de déterminer les quantités totales absorbées à chaque point. À partir de ces données, on peut calculer la quantité de substance d'essai absorbée par centimètre carré de peau exposée à la substance au cours de la période d'exposition.

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit préciser les conditions établies dans le protocole, justifier le choix du système d'essai utilisé, et également contenir les informations suivantes:

Substance d'essai:

— données d'identification [par exemple, numéro CAS si disponible; source; pureté (pureté radiochimique); impuretés connues; numéro du lot],

— état physique; propriétés physico-chimiques (par exemple, pH, volatilité, solubilité, stabilité, poids moléculaire et log P_{oe}).

Préparation de l'essai:

— formulation et justification de l'utilisation,

— détails de la préparation d'essai, quantité appliquée, concentration atteinte, véhicule, stabilité et homogénéité.

Animaux d'essai:

— espèce/souche utilisée,

— nombre, âge et sexe des animaux utilisés,

— source des animaux, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,

— poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions d'essai:

— détails concernant l'administration de la préparation d'essai (site d'application, méthodes d'essai, occlusion/non-occlusion, volume, extraction, détection),

— détails concernant la qualité de l'eau et la nourriture.

Résultats:

— tout signe de toxicité,

— tableau indiquant les données d'absorption (sous forme de taux, de quantités ou de pourcentage),

▼B

— récupérations totales de l'expérience,

— interprétation des résultats, avec comparaison avec toutes les autres données éventuellement disponibles concernant l'absorption de la substance d'essai.

Discussion des résultats

Conclusions

4. **BIBLIOGRAPHIE**

1. Méthode d'essai B.45. Absorption cutanée: méthode in vitro.

2. OCDE (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OCDE, Paris.

3. ECETOC (1993). Percutaneous Absorption. Centre européen d'écotoxicologie et de toxicologie des produits chimiques, Monographie No 20.

4. Zendzian, RP (1989). Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll Toxicol.* 8(5), p. 829-835.

5. Kemppainen, BW, Reifenrath, WG (1990). Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

6. EPA (1992). Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

7. EPA (1998). Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

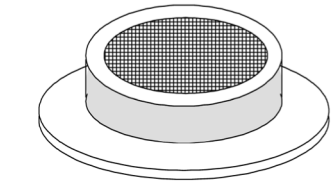
8. Bronaugh, RL, Wester, RC, Bucks, D, Maibach, HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, p. 369-373.

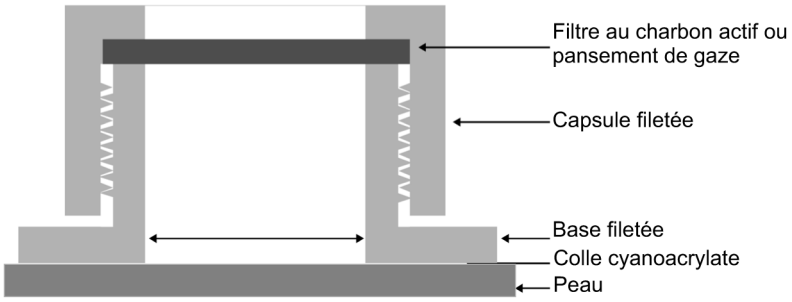
9. Feldman, RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol.* 54. p. 399-404.

▼B

Figure 1

Exemple de dispositif classiquement utilisé pour délimiter et protéger un site d'application cutanée au cours d'études d'absorption percutanée in vivo





▼B

B.45. **ABSORPTION CUTANÉE: MÉTHODE IN VITRO**

1. **MÉTHODE**

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 428 (2004) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

Cette méthode a été élaborée pour fournir des informations sur l'absorption d'une substance d'essai appliquée sur un échantillon de peau excisée. Elle peut être combinée à la méthode d'absorption cutanée: méthode in vivo (1), ou être menée séparément. Il est recommandé de consulter le document d'orientation de l'OCDE pour la conduite des études d'absorption cutanée (2) pour élaborer des études reposant sur cette méthode. Ce document d'orientation a été préparé pour faciliter la sélection des procédures in vitro appropriées, utilisables selon les circonstances spécifiques, et dans le but de garantir la fiabilité des résultats obtenus avec cette méthode.

Les méthodes de mesure de l'absorption cutanée se divisent en deux grandes catégories: in vivo et in vitro. Les méthodes *in vivo* d'étude de l'absorption cutanée sont bien connues et fournissent des informations pharmacocinétiques sur un large éventail d'espèces animales. Une méthode *in vivo* est décrite dans une autre méthode d'essai (1). Les méthodes in vitro sont utilisées depuis de nombreuses années pour mesurer l'absorption cutanée. Même s'il n'y a pas eu d'étude de validation formelle des méthodes *in vitro* présentées dans cette méthode d'essai, les experts de l'OCDE ont estimé en 1999 que le volume des données évaluées suffisait pour étayer la méthode in vitro (3). Le document d'orientation de l'OCDE (2) présente des détails supplémentaires appuyant cette décision, dont un certain nombre de comparaisons directes des méthodes in vitro et in vivo. De même, de nombreuses monographies examinent cette question et offrent un contexte de référence détaillé sur l'utilisation de la méthode in vitro (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12). Les méthodes in vitro mesurent la diffusion d'une substance dans et à travers la peau jusqu'à un réservoir de fluide; elles utilisent des échantillons de peau non viable pour mesurer la diffusion seule, ou des échantillons de peau fraîche et métaboliquement active pour mesurer simultanément la diffusion et le métabolisme cutané. Ces méthodes conviennent particulièrement pour comparer l'absorption cutanée et percutanée de différentes formulations d'une substance chimique, mais elles proposent aussi des modèles utiles pour l'évaluation de l'absorption percutanée chez l'homme.

La méthode in vitro ne convient pas nécessairement pour toutes les situations et classes de substances, mais on peut l'utiliser pour une première évaluation qualitative de la pénétration cutanée. Dans certains cas, il peut s'avérer nécessaire de compléter l'étude par des données in vivo. Pour des informations complémentaires sur les situations où la méthode in vitro conviendrait, il est recommandé de consulter le document d'orientation de l'OCDE (2). La référence (3) fournit d'autres précisions qui peuvent faciliter la prise de décision.

La présente méthode présente des principes généraux pour mesurer l'absorption cutanée et la diffusion d'une substance d'essai à partir d'un échantillon de peau excisée. Dans ce contexte, la peau de nombreuses espèces de mammifères, y compris l'homme, peut être utilisée. Les propriétés de perméabilité de la peau sont conservées après le prélèvement de l'échantillon de peau, dans la mesure où c'est le stratum corneum non viable qui constitue le principal obstacle à la diffusion; aucune forme de transport actif des substances chimiques à travers la peau n'a jamais été identifiée. En revanche, il a été établi que la peau pouvait métaboliser certaines substances au cours de l'absorption percutanée (6), mais ce processus ne limite pas la dose réellement absorbée, même si elle est susceptible d'affecter la nature du produit qui passe ensuite dans le sang.

▼B

1.2. DÉFINITIONS

Dose non absorbée: désigne la quantité retirée par nettoyage de la surface de la peau après exposition et toute quantité présente sur le timbre non occlusif, y compris toute quantité volatilisée au cours de l'exposition.

Dose absorbée (in vitro): masse de substance d'essai atteignant le fluide receveur (ou la circulation systémique) dans une période de temps donnée.

Dose absorbable (in vitro): désigne la quantité présente sur ou dans la peau après nettoyage.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance d'essai, le cas échéant radiomarquée, est appliquée à la surface d'un échantillon de peau séparant les deux chambres d'une cellule à diffusion. La substance chimique reste sur la peau pendant un temps donné et dans des conditions spécifiques, avant d'être retirée selon une procédure de nettoyage appropriée. Au cours de l'étude, on échantillonne le fluide receveur à des moments donnés, puis on l'analyse pour y rechercher la substance d'essai et/ou des métabolites.

Lorsque des systèmes métaboliquement actifs sont utilisés, les éventuels métabolites de la substance d'essai peuvent être analysés selon les méthodes appropriées. À la fin de l'expérience, la distribution de la substance d'essai est déterminée et ses métabolites sont quantifiés, le cas échéant.

Dans les conditions appropriées, décrites dans cette méthode et dans le document d'orientation (2), on mesure l'absorption d'une substance d'essai au cours d'une période de temps donnée en analysant le fluide receveur et la peau traitée. La substance d'essai restant sur la peau doit être considérée comme étant absorbée, à moins qu'il soit démontré que l'on puisse déterminer l'absorption sur la seule base des valeurs relatives au fluide receveur. L'analyse des autres éléments (matières récupérées par nettoyage de la peau et matières restant à l'intérieur des couches dermiques) permet d'enrichir l'évaluation des données, en précisant notamment l'évacuation totale de la substance d'essai et le pourcentage de récupération.

Pour démontrer les performances et la fiabilité du système d'essai dans le laboratoire chargé de l'étude, les résultats relatifs aux substances chimiques de référence pertinentes doivent être tenus disponibles et être conformes à la littérature publiée pour la méthode utilisée. Pour répondre à cette exigence, on peut procéder à un essai simultané de la substance d'essai et d'une substance de référence appropriée (présentant de préférence une lipophilicité proche de celle de la substance d'essai), ou proposer un historique approprié relatif à un certain nombre de substances de référence présentant une lipophilicité différente (par exemple, la caféine, l'acide benzoïque et la testostérone).

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. **Cellule à diffusion**

Une cellule à diffusion se compose d'un compartiment donneur et d'un compartiment receveur entre lesquels on place la peau (la figure 1 présente une cellule à diffusion de conception classique). La cellule doit répondre à plusieurs objectifs: assurer une bonne étanchéité sur le pourtour de la peau, permettre un échantillonnage aisé et un bon mélange de la solution dans le compartiment receveur en contact avec le dessous de la peau, et garantir le maintien de la température voulue au niveau de la cellule et de son contenu. Des cellules à diffusion statique ou dynamique peuvent indifféremment être utilisées. Normalement, les compartiments donneurs sont laissés sans occlusion pendant l'exposition à une dose finie d'une préparation d'essai. Toutefois, pour les applications infinies et pour certains scénarios avec des doses finies, l'occlusion du compartiment donneur peut être envisagée.

▼B

1.4.2. **Fluide receveur**

L'emploi d'un fluide receveur compatible avec des éléments physiologiques doit être privilégié, mais d'autres fluides peuvent être utilisés à condition que ce choix soit justifié. La composition précise du fluide receveur doit être fournie. La bonne solubilité de la substance d'essai dans le fluide receveur doit être démontrée, de façon à garantir qu'il ne fait pas obstacle à l'absorption. En outre, le fluide receveur ne doit pas affecter l'intégrité de la préparation cutanée. Dans un système dynamique, la vitesse de l'écoulement ne doit pas gêner la diffusion de la substance d'essai dans le fluide receveur. Dans une cellule statique, le fluide doit être remué en permanence et échantillonné régulièrement. Si le métabolisme entre également dans le cadre de l'étude, le fluide receveur doit garantir la viabilité de la peau pendant toute la durée de l'expérience.

1.4.3. **Préparations de peau**

On peut utiliser indifféremment de la peau d'origine humaine ou animale. Il est entendu que l'utilisation de la peau humaine est soumise à des conditions et considérations d'éthique admises d'ordre national et international. L'utilisation d'une peau viable est préférable, mais une peau non viable peut aussi être utilisée dès lors que son intégrité est démontrée. Des membranes d'épiderme (séparées par procédé enzymatique, chimique ou à la chaleur) ou certaines strates de peau (d'une épaisseur généralement comprise entre 200 et 400 μm) préparées avec un dermatome peuvent être utilisées. Des épaisseurs de peau complètes peuvent être utilisées, mais il convient d'éviter les épaisseurs excessives (environ > 1 mm), sauf si elles sont spécifiquement requises pour examiner la substance d'essai dans les couches de la peau. Les différents choix effectués (espèce retenue, site anatomique et technique de préparation) doivent être justifiés. Des données acceptables pour un minimum de quatre essais répétés par préparation d'essai doivent être fournies.

1.4.4. **Intégrité de la préparation cutanée**

Il est essentiel que la peau soit correctement préparée. Toute manipulation inappropriée peut endommager le stratum corneum; il convient donc de contrôler l'intégrité de la peau préparée. Si le champ de l'étude englobe le métabolisme de la peau, une peau fraîchement excisée doit être utilisée dans les plus courts délais, et dans des conditions propres à soutenir l'activité métabolique. De manière générale, la peau fraîchement excisée doit être utilisée dans les 24 heures, mais la période de stockage acceptable peut varier selon le système enzymatique impliqué dans la métabolisation et les températures de stockage (13). Lorsque les préparations de peau ont été stockées avant utilisation, des éléments établissant qu'elles ont conservé toutes leurs fonctions doivent être présentés.

1.4.5. **Substance d'essai**

La substance d'essai est le produit dont on étudie les caractéristiques de pénétration. Dans l'idéal, cette substance d'essai doit être radiomarquée.

1.4.6. **Préparation d'essai**

La préparation de la substance d'essai (c'est-à-dire la préparation pure, diluée ou le mélange contenant la substance d'essai à appliquer sur la peau) doit être identique (ou représenter un substitut réaliste) aux produits auxquels peuvent être exposés l'homme ou les autres espèces cibles. Toute modification par rapport à la préparation «d'usage» doit être justifiée.

▼B

1.4.7. **Concentrations et formulations des substances d'essai**

Normalement, plusieurs concentrations de la substance d'essai sont utilisées, de façon à couvrir le haut de la gamme des expositions humaines potentielles. De la même manière, on peut envisager d'étendre l'étude à un éventail de formulations classiques.

1.4.8. **Application sur la peau**

Dans les conditions normales de l'exposition humaine aux produits chimiques, des doses limites sont généralement rencontrées. Par conséquent, il convient d'utiliser des doses correspondant à l'exposition humaine potentielle, soit généralement 1 à 5 mg/cm^2 pour une substance solide et jusqu'à 10 $\mu l/cm^2$ pour les liquides. La quantité retenue doit être justifiée par les conditions d'utilisation attendues, les objectifs fixés pour l'étude, ou les caractéristiques physiques de la préparation d'essai. Par exemple, des applications infinies sur la surface de la peau peuvent être envisagées s'il s'agit d'étudier une exposition à des volumes importants par unité de surface.

1.4.9. **Température**

La température a une incidence sur la diffusion passive des produits chimiques (et ainsi sur leur absorption cutanée). Par conséquent, la cellule à diffusion et la peau doivent être maintenues à une température constante proche de la température normale de la peau, soit 32 +/- 1 ^oC. Selon la conception de la cellule, la température du bain ou du bloc de chauffage pourra varier, l'objectif étant de maintenir la peau et le compartiment receveur à leur norme physiologique. De préférence, l'humidité doit être maintenue entre 30 et 70 %.

1.4.10. **Durée de l'exposition et échantillonnage**

L'exposition de la peau à la préparation d'essai peut durer tout le temps de l'expérience, ou moins longtemps (par exemple pour imiter un type spécifique d'exposition humaine). La peau doit être lavée, à l'aide d'un agent lavant approprié, pour éliminer les excédents de la préparation d'essai, et les produits de rinçage utilisés doivent être collectés pour analyse. La procédure de retrait de la préparation, qui dépend des conditions d'utilisation envisagées, doit être justifiée. Normalement, une période d'échantillonnage de 24 heures est nécessaire pour permettre une caractérisation adéquate du profil d'absorption. Sachant que l'intégrité de la peau peut commencer à se détériorer au-delà de 24 heures, la durée d'échantillonnage ne doit normalement pas excéder 24 heures. Cette durée n'est pas nécessaire pour les substances d'essai qui pénètrent rapidement la peau, mais pour celles qui pénètrent lentement, des temps plus importants peuvent se révéler nécessaires. La fréquence d'échantillonnage du fluide receveur doit permettre d'établir une représentation graphique du profil d'absorption de la substance d'essai.

1.4.11. **Procédures terminales**

Tous les éléments du système d'essai (compartiment donneur, produits de rinçage de la surface de la peau, préparation cutanée et compartiment/fluide receveur) doivent être analysés et le niveau de récupération déterminé. Dans certains cas, il peut être nécessaire de fractionner la peau en zone de peau exposée et zone de peau sous le rebord de la cellule, et en couches correspondant au stratum corneum, à l'épiderme et aux différentes strates du derme, pour procéder à des analyses séparées.

1.4.12. **Analyse**

Dans toutes les études, un niveau de récupération approprié doit être atteint (à savoir une moyenne de 100 +/- 10 % de la radioactivité, tous les écarts devant être justifiés). La quantité de substance d'essai dans le fluide receveur, la préparation cutanée, les produits de rinçage de la surface de la peau et des appareils doivent être analysés selon des procédures appropriées.

▼B

2. **RÉSULTATS**

L'analyse du fluide receveur, la distribution de la substance d'essai dans le système d'essai et le profil d'absorption dans le temps doivent être présentés. Dans des conditions d'exposition à une dose finie, la quantité de substance éliminée lors du nettoyage de la peau, la quantité présente dans la peau (et dans les différentes couches dermiques si celles-ci ont fait l'objet d'une analyse) et la quantité présente dans le fluide receveur (taux et quantité ou pourcentage de la dose appliquée) doivent être calculées. Parfois, l'absorption cutanée peut être exprimée à partir des seules données relatives au fluide receveur. Toutefois, lorsque de la substance d'essai reste dans la peau à la fin de l'étude, il peut être nécessaire de l'inclure dans la quantité totale absorbée [voir paragraphe 66 de la référence (3)]. Dans des conditions d'exposition à une dose infinie, les données peuvent permettre de calculer une constante de perméabilité (Kp). Dans ce dernier cas, le pourcentage absorbé n'est pas pertinent.

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit préciser les conditions établies dans le protocole, justifier le choix du système d'essai utilisé, et également contenir les informations suivantes:

Substance d'essai:

— état physique; propriétés physico-chimiques (au minimum, poids moléculaire et log P_{oe}), pureté (pureté radiochimique),

— informations d'identification (par exemple numéro de lot),

— solubilité dans le fluide receveur.

Préparation de la substance d'essai:

— formulation et justification de l'utilisation,

— homogénéité.

Conditions d'essai:

— sources et site de la peau, méthode de préparation, conditions de stockage avant utilisation, prétraitement éventuel (nettoyage, traitement antibiotique, etc.), mesures de l'intégrité de la peau, état métabolique, justification de l'utilisation,

— conception de la cellule à diffusion, composition du fluide receveur, vitesse d'écoulement du fluide receveur ou temps et procédures d'échantillonnage,

— détails de l'application de la préparation d'essai et quantification de la dose appliquée,

— durée de l'exposition,

— détails sur l'élimination de la préparation d'essai présente sur la peau (par exemple rinçage de la peau),

— détails sur l'analyse de la peau et les techniques de fractionnement employées pour mettre en évidence la distribution dans la peau,

▼B

— procédures de nettoyage de la cellule et du matériel,

— méthodes d'essai, techniques d'extraction, seuils de détection et validation de la méthode analytique.

Résultats:

— récupération totale de l'expérience (dose appliquée = produits de rinçage de la peau + peau + fluide receveur + produits de rinçage de la cellule),

— tableau indiquant la récupération de chaque cellule dans chaque compartiment,

— profil d'absorption,

— tableau indiquant les données relatives à l'absorption (sous forme de taux, de quantités ou de pourcentages).

Discussion des résultats

Conclusions

4. **BIBLIOGRAPHIE**

1. Méthode d'essai B.44. Absorption cutanée: méthode in vivo.

2. OCDE (2002). Document d'orientation de l'OCDE pour la conduite des études d'absorption cutanée, OCDE, Paris.

3. OCDE (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OCDE, Paris.

4. Kemppainen, BW and Reifenrath, WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

5. Bronaugh, RL and Collier, SW. (1991). Protocol for In vitro Percutaneous Absorption Studies, in In vitro *Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications,* RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, p. 237-241.

6. Bronaugh, RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications.* CRC Press, Boca Raton.

7. Centre européen d'écotoxicologie et de toxicologie des produits chimiques (1993). Monograph No 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

8. Diembeck, W, Beck, H, Benech-Kieffer, F, Courtellemont, P, Dupuis, J, Lovell, W, Paye, M, Spengler, J, Steiling, W (1999). Test Guidelines for In Vitro Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, p. 191-205.

9. Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No 65.

10. Howes, D, Guy, R, Hadgraft, J, Heylings, JR *et* al. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

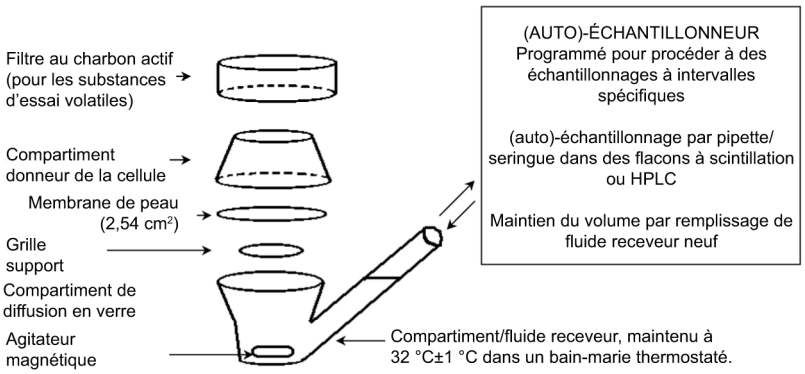
11. Schaefer, H and Redelmeier, TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

12. Roberts, MS and Walters, KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

13. Jewell, C, Heylings, JR., Clowes, HM. and Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74, p. 356-365.

Figure 1

Exemple de cellule à diffusion statique classiquement utilisée pour la conduite d'études d'absorption percutanée in vitro



▼M8

B.46. IRRITATION CUTANÉE *IN VITRO*: ESSAI SUR ÉPIDERME HUMAIN RECONSTITUÉ

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 439 (2015) de l'OCDE. L'irritation cutanée désigne l'apparition sur la peau de lésions réversibles à la suite de l'application d'un produit chimique pendant une période allant jusqu'à quatre heures [selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU)] (1) et le règlement (CE) n° 1272/2008 de l'Union européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (ci-après le «règlement CLP») ([1]). La présente méthode d'essai propose une procédure *in vitro* pouvant servir à identifier les dangers liés aux produits chimiques (substances et mélanges) irritants, classés en catégorie 2, telle que définie par le SGH de l'ONU/le règlement CLP (2). Pour les régions n'ayant pas adopté la catégorie 3 facultative (produits chimiques faiblement irritants) selon le SGH de l'ONU, la présente méthode d'essai peut aussi servir à identifier des produits chimiques non classés. Par conséquent, suivant le cadre réglementaire et le système de classification en vigueur, cette méthode d'essai peut être utilisée pour déterminer le pouvoir irritant pour la peau d'un produit chimique, en tant que méthode de substitution à part entière remplaçant l'essai d'irritation cutanée *in vivo*, ou en tant que méthode substitutive partielle, dans le cadre d'une stratégie d'essai (3).

2. Jusqu'à présent, l'évaluation de l'irritation cutanée impliquait généralement le recours à des animaux de laboratoire [méthode d'essai B.4, équivalente à la ligne directrice 404 de l'OCDE, adoptée en 1981 et révisée en 1992, 2002 et 2015] (4). Pour tester le potentiel de corrosivité, trois méthodes d'essai *in vitro* validées ont été adoptées par l'Union européenne: elles constituent respectivement les méthodes d'essai B.40 (équivalente à la ligne directrices 430 de l'OCDE), B.*40bis* (équivalente à la ligne directrice 431 de l'OCDE) et B.65 (équivalente à la ligne directrice 435 de l'OCDE) (5) (6) (7). Un Document Guide de l'OCDE sur les Approches Intégrées sur les Essais et l'Évaluation (IATA) pour l'irritation et la corrosion de la peau décrit plusieurs modules qui rassemblent les sources d'information et les outils d'analyse et (i) fournit des orientations sur la façon d'intégrer et d'utiliser les données d'essais et autres données pour l'évaluation du potentiel d'irritation ou de corrosion de la peau des produits chimiques d'essaiet (ii) propose une approche quand des essais supplémentaires sont requis (3).

3. La présente méthode d'essai porte sur le danger d'irritation cutanée pour la santé humaine. Elle fait appel à un système d'essai *in vitro* utilisant un épiderme humain reconstitué qui reproduit fidèlement les propriétés biochimiques et physiologiques des couches supérieures de la peau humaine, c'est-à-dire l'épiderme. Le système d'épiderme humain reconstitué utilise des dérivés de kératinocytes humains non transformés comme source cellulaire afin de reconstruire un modèle d'épiderme comprenant une cyto-architecture et une histologie représentatives. Un ensemble de normes de performance ont été développées afin de faciliter la validation et l'évaluation de méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué similaires ou modifiées, conformément aux principes du document d'orientation n°34 de l'OCDE (8) (9). La présente méthode d'essai a été initialement adoptée en 2010, puis mise à jour une première fois en 2013 afin d'y inclure de nouvelles méthodes d'essai faisant usage du modèle de peau humaine reconstituée, puis une seconde fois en 2015 afin d'y inclure la référence au document guide IATA et d'y introduire une procédure alternative de mesure de la viabilité cellulaire.

4. Des études de pré-validation, d'optimisation et de validation ont été réalisées pour quatre modèles d'essai *in vitro* disponibles dans le commerce (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) utilisant un modèle d'épiderme humain reconstitué (sensibilité de 80 %, spécificité de 70 % et précision de 75 %). Ces quatre modèles d'essai sont

([1]) Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) no 1907/2006, JO L 353 du 31.12.2008, p. 1.

▼**M8**

inclus dans la présente méthode d'essai et sont énumérés dans l'appendice 2 qui fournit également des informations sur le type d'étude de validation menée pour valider chaque méthode respectivement. Comme noté dans l'appendice 2, la méthode de référence validée (MRV) a été utilisée pour développer la présente méthode d'essai, y compris les normes de performance (8).

5. L'acceptation mutuelle des données ne sera garantie pour les modèles d'essai validés selon les normes de performance (8) que si ces modèles d'essai ont été examinés et adoptés par l'OCDE. Les modèles d'essai inclus dans la présente méthode d'essai et dans la ligne directrice correspondante de l'OCDE peuvent être utilisés sans discrimination dans le but de répondre aux exigences réglementaires des pays et de générer des résultats d'essai issus de l'une des méthodes d'essai *in vitro* sur l'irritation de la peau, tout en bénéficiant de l'acceptation mutuelle des données.

6. Les définitions des termes utilisés dans ce document figurent à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

7. L'une des limites de la présente méthode d'essai, comme l'a démontré l'étude de validation prospective complète évaluant et caractérisant les méthodes d'essai sur l'épiderme humain reconstitué (16), est qu'elle ne permet pas la classification des produits chimiques dans la catégorie facultative 3 (produits chimiques faiblement irritants) du SGH de l'ONU (1). Par conséquent, son utilisation sera fonction de la réglementation en vigueur dans les pays membres. Pour une évaluation complète des effets cutanés locaux faisant suite à une exposition unique, le document guide n° 203 de l'OCDE sur les Approches Intégrées pour les Essais et l'Évaluation doit être consulté (3). Il est entendu que l'utilisation de peau humaine est soumise à des conditions et considérations d'éthique nationales et internationales.

8. La présente méthode d'essai se rapporte aux effets d'irritation de la peau humaine. Si elle ne fournit pas d'informations appropriées sur la corrosion cutanée, on notera cependant que la méthode d'essai B.40 *bis* (équivalente à la méthode d'essai 431 de l'OCDE) relative à la corrosion cutanée, bien que faisant appel à un protocole différent, est basée sur le même système d'essai sur épiderme humain reconstitué (6). La présente méthode d'essai a recours à des modèles d'épiderme humain reconstitué utilisant des kératinocytes humains, et reproduisant donc in vitro l'organe cible de l'espèce étudiée. De plus, elle couvre directement l'étape initiale de la cascade inflammatoire/du mécanisme d'action (lésions cellulaires et tissulaires causant un traumatisme localisé) survenant au cours de l'irritation in vivo. Les essais réalisés dans le cadre de l'étude de validation sous-tendant cette méthode d'essai ont porté sur un large éventail de produits chimiques; la base de données de cette étude totalisait 58 produits chimiques (16) (18) (23). La présente méthode d'essai peut être utilisée pour tester des solides, des liquides, des semi-solides et des cires. Les liquides peuvent être aqueux ou non; les solides peuvent être solubles ou insolubles dans l'eau. Si possible, les solides sont moulus finement avant application; aucun autre prétraitement de l'échantillon n'est nécessaire. Les gaz et les aérosols n'ont pas encore fait l'objet d'une étude de validation (29). Bien qu'il soit envisageable de pouvoir tester des gaz et des aérosols en faisant appel à de l'épiderme humain reconstitué, l'actuelle méthode d'essai ne permet pas de tester les produits de ce type.

9. Avant d'utiliser la présente méthode d'essai pour tester un mélange afin de générer des données dans un but réglementaire, il convient de s'assurer et de justifier le cas échéant, que les données générées seront adéquates. De telles dispositions ne sont pas nécessaires quand il existe une exigence réglementaire de tester le mélange. Cependant, du fait que les mélanges couvrent une large gamme de catégories et de composition, et que l'information sur les essais de mélanges est encore parcellaire, il convient de ne pas utiliser la

▼M8

présente méthode d'essai pour une catégorie spécifique de mélanges quand il a été démontré que cette méthode ne s'applique pas à cette catégorie spécifique (par exemple en suivant la stratégie proposée par Eskes et al en 2012 (30)). Des précautions similaires doivent être prises dans les cas où des classes ou des propriétés physico-chimiques spécifiques limitent l'utilisation de la méthode d'essai.

10. Les produits chimiques d'essai absorbant la lumière dans la même gamme que le MTT formazan et les produits chimiques d'essai capable de réduire de façon directe le colorant vital MTT (en MTT formazan) peuvent interférer avec les mesures de viabilité cellulaire et requirent l'utilisation de témoins adaptés pour la correction 9voir paragraphes 28 à 34).

11. Une seule expérience réalisée à l'aide de trois réplicats de tissus identiques devrait suffire pour tester les produits chimiques dont la classification est sans équivoque. En revanche, dans le cas de résultats ambigus, tels que des mesures non concordantes pour les différents réplicats et/ou une viabilité moyenne égale à 50 ± 5 %, une seconde expérience est envisagée, voire une troisième en cas de résultats discordants entre les deux premières.

PRINCIPE DE L'ESSAI

12. Le produit chimique est appliqué localement sur un modèle tridimensionnel d'épiderme humain reconstitué, composé de kératinocytes non transformés prélevés sur épiderme humain et mis en culture pour former un modèle multicouche hautement différencié d'épiderme humain. Ce modèle se compose de couches organisées (basale, épineuse et granuleuse), ainsi que d'un stratum corneum multicouche contenant des couches lipidiques lamellaires intercellulaires représentant les principales classes de lipides, similaires à celles que l'on observe in vivo.

13. L'irritation cutanée consécutive à l'application d'un produit chimique, qui se manifeste principalement par des érythèmes ou des œdèmes, résulte d'une cascade d'évènements débutant par la pénétration du produit chimique à travers le stratum corneum où il peut causer la lésion des couches sous-jacentes de kératinocytes et les autres cellules de la peau. En mourant, les cellules lésées peuvent soit rejeter des médiateurs de l'inflammation ou induire la cascade inflammatoire qui agit aussi sur les cellules du derme, en particulier les cellules stromales et endothéliales des vaisseaux sanguins. C'est la dilatation et la perméabilité accrue des cellules endothéliales qui sont responsables des érythèmes et des œdèmes observés (29). Il faut noter que les méthodes d'essai fondées sur l'utilisation d'épiderme humain reconstitué permettent de mesurer les événements déclencheurs de la cascade, p.ex. les lésions cellulaires et tissulaires (16) (17), en l'absence de toute vascularisation du système d'essai in vitro, grâce à la lecture de la viabilité cellulaire.

14. La viabilité cellulaire des modèles d'épiderme humain reconstitué est mesurée via la conversion enzymatique du colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, numéro CAS 298-93-1] en un sel de formazan bleu mesuré quantitativement après son extraction des tissus (31). Les produits chimiques irritants sont mis en évidence par leur capacité à faire chuter la viabilité cellulaire sous un seuil prédéterminé (≤ 50 %, pour la catégorie 2 du SGH de l'ONU/du règlement CLP). En fonction du cadre législatif et de l'applicabilité de la présente méthode d'essai, les produits chimiques d'essai produisant une viabilité cellulaire supérieure au seuil défini peuvent être considérés comme non irritants (> 50 %, sans catégorie).

▼M8

DEMONSTRATION DES COMPÉTENCES

15. Avant d'appliquer en routine l'un des quatre modèles d'essai validés conformément à la présente méthode d'essai (appendice 2), les laboratoires font la preuve de leur compétence technique en utilisant les 10 substances énumérées au tableau 1. Dans le cas où une substance figurant dans le tableau 1 serait indisponible, où dans d'autres cas où il est justifié de la remplacer par une autre substance (par exemple à partir de la liste de substances de référence (8)), cette autre substance peut être utilisée si des données de référence appropriées in vivo et in vitro sont disponibles, et dans la mesure où les mêmes critères de sélection que ceux décrits sous le tableau 1 sont utilisés. L'utilisation d'une substance d'épreuve de compétence autre que celles énumérées au tableau 1 doit être justifiée.

16. Dans le cadre de la démonstration des compétences, il est recommandé aux utilisateurs de contrôler les propriétés de barrière des tissus dès réception, comme précisé par le producteur du modèle d'épiderme humain reconstitué. Cette étape est particulièrement importante lorsque les tissus sont transportés sur de longues distances/durées. Lorsqu'une méthode d'essai a été établie avec succès, et que le laboratoire a acquis et démontré sa maîtrise de cette méthode, il ne sera plus nécessaire de procéder systématiquement à cette vérification. Toutefois, pour les méthodes d'essai utilisées en routine, il est recommandé de continuer à évaluer les propriétés de barrière des tissus à intervalles réguliers.

Tableau 1

Substances utilisées pour les épreuves de compétence [1]

Substance	Numéro CAS	Score in *vivo* [2]	État physique	Catégorie du SGH de l'ONU
SUBSTANCES NON CLASSÉES (Sans catégorie dans le SGH de l'ONU)				
Acide naphtylacétique	86-87-3	0	Solide	sans catégorie
isopropanol	67-63-0	0,3	liquide	sans catégorie
stéarate de méthyle	112-61-8	1	solide	sans catégorie
butyrate d'heptyle	5870-93-9	1,7	liquide	sans catégorie *(cat. 3 facultative)* [3]
salicylate d'hexyle	6259-76-3	2	liquide	sans catégorie (*cat. 3 facultative*) [3]
SUBSTANCES CLASSÉES (Catégorie 2 du SGH de l'ONU)				
3-p-cuménil-2-méthylpropionaldéhyde	103-95-7	2,3	liquide	catégorie 2
1-bromohexane	111-25-1	2,7	liquide	catégorie 2
hydroxyde de potassium (solution aqueuse à 5 %)	1310-58-3	3	liquide	catégorie 2
1-méthyl-3-phényl-1-pipérazine	5271-27-2	3,3	solide	catégorie 2
heptanal	111-71-7	3,4	liquide	catégorie 2

(1) Ces produits chimiques constituent un sous-ensemble des produits chimiques utilisés dans l'étude de validation et leur sélection repose sur les critères suivants: (i) les substances chimiques sont disponibles dans le commerce, (ii) ils sont représentatifs de la gamme de scores d'irritation obtenus avec le test de Draize (de non-irritant à fortement irritant), (iii) ils ont une structure chimique bien définie, (iv) ils sont représentatifs des fonctions chimiques utilisées dans le processus de validation, (v) ils ont donné des résultats in vitro au cours des nombreux essais dans de nombreux laboratoires, (vi) ils ont fourni des prédictions in vitro correctes, et (vii) ils ne sont pas associés à un profil extrêmement toxique (par exemple cancérogène ou toxique pour la reproduction) et ils ne sont pas associés à des coûts de recyclage prohibitifs).

(2) Score in vivo d'après la méthode d'essai B.4 (4).

(3) Dans cette méthode d'essai, les substances classées dans la catégorie facultative 3 du SGH de l'ONU (matières faiblement irritantes) (1) sont considérées comme «sans catégorie».

▼M8

PROTOCOLE

17. Les éléments et le protocole d'une méthode d'essai d'irritation cutanée sur épiderme humain reconstitué sont décrits ci-après (voir aussi l'annexe 3 concernant les paramètres liés à chaque modèle d'essai). Il existe des modes opératoires normalisés pour les quatre modèles d'essai contenus dans la méthode d'essai (32) (33) (34) (35).

ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI SUR ÉPIDERME HUMAIN RECONSTITUÉ

Conditions générales

18. L'épiderme est reconstruit à partir de kératinocytes humains non transformés. Plusieurs couches de cellules épithéliales viables (couche basale, stratum spinosum, stratum granulosum) doivent être présentes sous un stratum corneum fonctionnel. Le stratum corneum doit comporter plusieurs couches présentant le profil lipidique nécessaire pour constituer une barrière fonctionnelle suffisamment robuste pour résister à la pénétration rapide de substances cytotoxiques de référence telles que le dodécylsulfate de sodium (SDS) ou le Triton X-100. La fonction de barrière est démontrée et peut être évaluée soit en déterminant la concentration à laquelle une substance de référence réduit la viabilité des tissus de 50 % (CI_{50}) après un temps d'exposition donné, soit en définissant le temps d'exposition requis pour réduire la viabilité des cellules de 50 % (TE_{50}) après application de la substance de référence à une concentration fixe déterminée. Le modèle d'épiderme humain reconstitué présente des propriétés de confinement suffisantes pour éviter que de la matière puisse contourner le stratum corneum pour atteindre les tissus viables, ce qui nuirait à la qualité de la modélisation de l'exposition cutanée. Enfin, le modèle est exempt de toute contamination bactérienne, virale, mycoplasmique ou mycosique.

Conditions fonctionnelles

Viabilité

19. L'essai utilisé pour quantifier la viabilité est l'essai MTT (31). Les cellules viables de l'épiderme humain reconstruit peuvent réduire le colorant vital MTT en un précipité bleu de MTT formazan qui est alors extrait des tissus au moyen de l'isopropanol (ou un solvant similaire). La densité optique du solvant d'extraction seul doit être suffisamment faible, c'est-à-dire inférieur à 0,1. Le MTT formazan extrait peut être quantifié soit par la mesure de l'absorbance standard (DO) ou par une procédure de spectrophotométrie HPLC-UPLC (36). Les utilisateurs du modèle d'épiderme humain reconstitué font en sorte que chaque lot utilisé réponde aux critères définis pour le témoin négatif (TN). Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour le témoin négatif (dans les conditions de la méthode d'essai d'irritation cutanée) est établie par le développeur/fournisseur du modèle d'épiderme humain reconstitué. Les plages d'acceptabilité pour les quatre modèles validés comprises dans cette méthode d'essai sont indiquées dans le tableau 2. L'utilisateur de spectrophotométrie HPLC-UPLC utilisera la gamme de DO du témoin négatif fournie au tableau 2 comme critère pour le contrôle négatif. Il doit être prouvé que les tissus traités par le témoin négatif sont stables en culture (c'est-à-dire qu'ils présentent des mesures de viabilité comparables) tout au long de la période d'exposition.

Tableau 2

Plages d'acceptabilité des valeurs de DO du témoin négatif des modèles d'essai de cette MRV

	Valeur limite inférieure d'acceptation	Valeur limite supérieure d'acceptation
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8

▼**M8**

	Valeur limite inférieure d'acceptation	Valeur limite supérieure d'acceptation
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Fonction de barrière

20. Le *stratum corneum* et sa composition lipidique doivent être suffisants pour résister à la pénétration rapide de substances cytotoxiques de référence telles que le SDS ou le Triton X-100. Cette capacité est évaluée par la CI_{50} et le TE_{50} (tableau 3).

Morphologie

21. L'examen histologique du modèle d'épiderme humain reconstitué doit mettre en évidence une structure semblable à celle de l'épiderme humain (comprenant notamment un *stratum corneum* multicouche).

Reproducibilité

22. La reproductibilité dans le temps des résultats obtenus à l'aide des témoins positifs et négatifs doit être démontrée.

Contrôle de qualité

23. Il est impératif que le développeur/fournisseur du modèle d'épiderme humain reconstitué garantisse et démontre que chaque lot utilisé répond à des critères de fabrication définis, dont les plus pertinents sont ceux relatifs à la *viabilité* (paragraphe 19), à la *fonction de barrière* (paragraphe 20) et à la *morphologie* (paragraphe 21). Ces informations sont communiquées aux utilisateurs, afin qu'ils puissent les inclure dans le rapport d'essai. Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour les valeurs CI_{50} ou TE_{50} est établie par le développeur/fournisseur d'épiderme humain. Seuls les résultats obtenus à l'aide de tissus répondant à ces critères pourront être retenus pour prédire de façon fiable les effets irritants des produits chimiques d'essai. Les plages d'acceptabilité pour les quatre modèles d'essai inclus dans la présente méthode d'essai sont indiquées dans le tableau 3.

Tableau 3

Critères de contrôle de qualité des lots pour les modèles d'essai inclus dans la présente méthode d'essai

	Valeur limite inférieure d'acceptation	Valeur limite supérieure d'acceptation
EpiSkin™ (SM) (18 hours treatment with SDS) (32)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (33)	ET_{50} = 4,0 hr	ET_{50} = 8,7 hr
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 hr	ET_{50} = 10,0 hr
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 hours treatment with SDS) (35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

▼M8

Application des produits chimiques d'essai et des produits chimiques témoins

24. Il convient d'utiliser au minimum trois réplicats par essai pour chaque produit chimique d'essai et pour les témoins. Pour les produits chimiques liquides comme pour les produits chimiques solides, il convient d'appliquer une quantité suffisante de produit chimique pour recouvrir uniformément la surface de la peau, sans pour autant utiliser une dose infinie, c'est à dire dans une gamme de 26 à 83 µL/cm2 ou mg/cm2(voir l'appendice 3). Dans le cas de produits chimiques solides, il convient d'humidifier la surface de l'épiderme avec de l'eau déionisée ou distillée avant application, afin d'assurer un bon contact entre la substance d'essai et la surface de l'épiderme. Chaque fois que possible, il convient de tester les solides sous la forme d'une poudre fine. Un filet en nylon peut être utilisé pour aider l'étalement de la poudre en couche fine si nécessaire (voir appendice 3). À la fin de la période d'exposition, la surface de l'épiderme est nettoyée avec soin à l'aide d'un tampon aqueux ou de NaCl à 0,9 %, afin d'éliminer le produit chimique d'essai. En fonction de la méthode sur épiderme humain reconstitué utilisée, la période d'exposition peut s'étendre de entre 15 à 60 minutes et la température d'incubation entre 20 et 37 °C. Les durées et températures d'exposition sont optimisées pour chacun des modèles d'essai sur épiderme humain reconstitué, et tiennent compte des propriétés intrinsèques de chaque modèle (p. ex. la fonction de barrière) (voir appendice 3).

25. Des témoins négatifs (TN) et positifs (TP) sont utilisés simultanément pour chaque étude afin de démontrer que la viabilité (dans le cas du TN), la fonction de barrière et la sensibilité tissulaire qui en résulte (dans le cas du TP) se situent dans une fourchette historique définie de valeurs acceptables. La substance recommandée en tant que TP est une solution aqueuse de SDS à 5 %. Pour les TN, il est recommandé d'utiliser de l'eau ou une solution saline tamponnée au phosphate [phosphate buffered saline (PBS)].

Mesures de la viabilité cellulaire

26. Selon le protocole, il est essentiel que mesures de la viabilité ne soient pas réalisées immédiatement après l'exposition au produit chimique d'essai, mais après une période d'incubation post-traitement suffisamment longue du tissu rincé dans un milieu frais. Cette période permet aussi bien la disparition des effets faiblement cytotoxiques que l'apparition d'effets cytotoxiques manifestes. Une période d'incubation post-traitement de 42 heures s'est révélée optimale au cours de l'optimisation de deux des modèles d'essai basés sur l'épiderme humain reconstitué sous-tendant cette méthode d'essai (11)(12)(13)(14)(15).

27. Le test du MTT est une méthode quantitative standardisée, recommandée pour mesurer la viabilité cellulaire dans le cadre de cette méthode d'essai. Elle est compatible avec une utilisation sur un modèle tissulaire tridimensionnel. L'échantillon de tissu est placé dans une solution MTT à la concentration appropriée (par exemple, 0,3-1 mg/ml) pendant 3 heures. Le MTT est converti en bleu de formazan par les cellules viables. Le précipité bleu de formazan est ensuite extrait à l'aide d'un solvant (ex.: isopropanol, isopropanol acide), et l'on mesure la concentration du formazan en déterminant sa DO à 570 nm à l'aide d'un filtre passe-bande de ±30 nm au maximum, ou en utilisant une procédure de spectrophotométrie HPLC-UPLC (voir paragraph 34) (36).

28. Les propriétés optiques du produit chimique d'essai ou son action chimique sur le MTT (p. ex. les produits chimiques peuvent aussi bien inhiber ou faire disparaître la coloration que la provoquer) sont susceptibles d'interférer avec l'expérience et de conduire à une estimation erronée de la viabilité. Cela peut se produire lorsque le produit chimique d'essai n'a pas été totalement éliminé du tissu par rinçage ou lorsqu'il a pénétré dans l'épiderme. Si un produit chimique agit directement sur le MTT (p. ex. un agent réducteur du MTT), est naturellement coloré, ou s'il se colore durant le traitement du tissu, des

▼M8

contrôles supplémentaires sont pratiqués pour détecter et corriger les interférences du produit chimique avec la mesure de la viabilité (voir paragraphes 29 et 33). On trouvera une description détaillée de la manière de corriger la réduction directe du MTT ou les interférences dues aux agents colorants dans le mode opératoire normalisé des quatre modèles d'essai validés contenus dans cette méthode d'essai (32) (33) (34) (35).

29. Afin d'identifier les agents réducteurs directs du MTT, il convient d'ajouter chaque produit chimique d'essai à un milieu MTT fraîchement préparé. Si le mélange de MTT et de produit chimique d'essai (ou la suspension testée pour les produits chimiques d'essai insolubles) devient bleu/violet, on considère que le produit chimique d'essai est un réducteur direct du MTT et il convient alors de procéder à des vérifications fonctionnelles supplémentaires sur les modèles d'épiderme humain reconstruit non viables, indépendamment du choix de mesurer l'absorbance (OD) ou de procéder par analyse par HPLC/UPLC-spectrophotométrie. Cette vérification s'effectue sur des tissus tués qui ne présentent qu'une activité métabolique résiduelle, mais absorbent et retiennent le produit chimique d'essai dans des proportions similaires aux tissus viables. Chaque produit chimique réducteur du MTT est appliqué sur au moins deux réplicats de tissus tués qui sont soumis à la procédure d'essai complète pour générer un témoin de réduction non spécifique du MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Un seul témoin MTT NS par produit chimique d'essai suffit, indépendamment du nombre d'épreuves indépendantes menées. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit: le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au réducteur du MTT (%viabilité$_{test}$) moins le pourcentage de réduction non spécifique du MTT obtenu pour les tissus tués exposés au même réducteur du MTT et calculé en proportion du témoin négatif testé en parallèle de l'essai à corriger (%MTT NS), soit Viabilité tissulaire réelle = [%viabilité$_{test}$] - [%MTT NS].

30. Pour repérer les interférences potentielles par des produits chimiques d'essai colorés ou qui deviennent colorés en contact avec l'eau ou l'isopropanol, et pour déterminer si des témoins supplémentaires sont nécessaires, une analyse de spectre est menée sur les produits chimiques dans l'eau (environnement au moment de l'exposition) et/ou dans l'isopropanol (solvant d'extraction). Si le produit chimique d'essai dans l'eau et/ou dans l'isopropanol absorbe assez la lumière à une longueur d'onde de 570±30 nm, alors on considère que le produit chimique d'essai interfère avec la mesure de l'absorbance (DO) du formazan et des témoins colorés doivent être préparés, ou bien une procédure d'analyse par HPLC/UPLC-spectrophotométrie est employée et aucun témoin supplémentaire n'est nécessaire (voir paragraphes 33 et 34). Lorsque les mesures d'absorbance (DO) sont effectuées, chaque produit chimique d'essai causant une interférence est appliqué sur au moins deux réplicats de tissus viables, et les deux réplicats sont soumis à la procédure d'essai complète, à la seule différence qu'ils sont incubés dans le milieu plutôt que dans la solution MTT lors de l'étape de l'incubation avec MTT, afin de générer un témoin de couleur non spécifique dans les tissus vivants ($T_{vivants}$ NS). Le témoin $T_{vivants}$ NS est testé en parallèle de l'essai avec le produit chimique d'essai coloré et, dans le cas d'un essai multiple, un témoin $T_{vivants}$ NS indépendant est effectué pour chaque essai (dans chaque épreuve) pour tenir compte de la variabilité biologique inhérente aux tissus vivants. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit: le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au produit chimique causant une interférence et incubés avec la solution MTT (%viabilité$_{test}$) moins le pourcentage de couleur non spécifique obtenu pour les tissus vivants exposés au produit chimique causant une interférence et incubés dans du milieu sans MTT en parallèle de l'essai à corriger (%$T_{vivants}$ NS), soit Viabilité tissulaire réelle = [%viabilité$_{test}$] – [%$T_{vivants}$ NS].

31. Dans le cas des produits chimiques identifiés comme causant à la fois une réduction directe du MTT (voir paragraphe 29) et une interférence de couleurs (voir paragraphe 30), une troisième série de témoins est nécessaire lors de la mesure de l'absorbance (DO), en plus des témoins MTT NS et $T_{vivants}$ NS décrits aux paragraphes précédents. En général, ce cas se présente

▼**M8**

pour les produits chimiques d'essai foncés (bleus, violets, noirs, par exemple), car leur couleur intrinsèque empêche l'évaluation de leur potentiel de réduction directe du MTT décrite au paragraphe 29. Cela rend la réalisation des témoins MTT NS et $T_{vivants}$ NS obligatoires par principe. Les produits chimiques d'essai nécessitant la réalisation des deux témoins NSMTT et $CNS_{vivants}$ sont susceptibles d'être absorbés et retenus à la fois par les tissus vivants et par les tissus tués. Par conséquent et dans ce cas, l'utilisation du témoin NSMTT peut permettre de corriger l'essai non seulement en fonction du potentiel de réduction directe du MTT du produit chimique d'essai, mais aussi de l'interférence de couleurs dueà l'absorption et la rétention du produit chimique d'essai par les tissus tués. Cela signifie qu'une double correction pour tenir compte de l'interférence de couleurs peut devoir être effectuée, étant donné que le témoin $T_{vivants}$ NS permet déjà de tenir compte de l'interférence de couleurs due à l'absorption et à la rétention du produit chimique d'essai par les tissus vivants. Afin d'éviter cette double correction pour tenir compte de l'interférence de couleurs, un troisième témoin pour la couleur non spécifique dans les tissus tués (T_{morts} NS) doit être préparé. Dans ce témoin supplémentaire, le produit chimique d'essai est appliqué sur au moins deux réplicats de tissus tués qui sont soumis à la procédure d'essai complète mais qui sont incubés dans le milieu plutôt que dans la solution MTT lors de l'étape d'incubation avec MTT. Un seul témoin T_{morts} NS par produit chimique d'essai suffit, indépendamment du nombre d'épreuves, mais il doit être mené en parallèle du témoin NSMTT et sur le même lot de tissus. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit: le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au produit chimique d'essai (%viabilité$_{test}$) moins %NSMTT moins % $T_{vivants}$ NS plus le pourcentage de couleur non spécifique obtenu pour les tissus tués exposés au produit chimique d'essai causant une interférence et incubés dans du milieu sans MTT, calculé en proportion du témoin négatif mené en parallèle de l'essai à corriger (%T_{morts} NS), soit Viabilité tissulaire réelle = [%viabilité$_{test}$] - [%MTT NS] - [%$T_{vivants}$ NS] + [%T_{morts} NS].

32. Il importe de noter qu'une réduction non spécifique du MTT et des interférences de couleurs non spécifiques peuvent porter l'absorbance (DO) de l'extrait tissulaire au-dessus de la plage de linéarité du spectrophotomètre (lors des mesures de densité optique), et qu'une réduction non spécifique du MTT peut aussi élargir la surface de pic de formazan de l'extrait tissulaire au-delà de la plage de linéarité du spectrophotomètre (lors des mesures par HLCP/UPLC-spectrophotométrie). Il est donc important que chaque laboratoire détermine la plage de linéarité de son spectrophotomètre (pour la DO/surface de pic), par exemple à l'aide de formazan (CAS # 57360-69-7), disponible dans le commerce auprès de l'entreprise Sigma-Aldrich (Cat# M2003), avant de tester les produits chimiques à des fins réglementaires. Les mesures d'absorbance standard (DO) au moyen d'un spectrophotomètre sont pertinentes pour évaluer les réducteurs directs du MTT et les produits chimiques d'essai colorés quand la DO des extraits de tissus traités par le produit chimique d'essai sans correction pour la réduction directe du MTT et/ou pour les interférences de couleur sont dans la plage de linéarité du spectrophotomètre ou quand le pourcentage de viabilité non-corrigée obtenu avec le produit chimique d'essai est ≤ 50 %. Néanmoins, les résultats pour les produits chimiques d'essai indiquant % MTT NS et/ou $T_{vivants}$ NS ≥ 50 % du témoin négatif doivent être interprétés avec précaution car ce seuil représente la limite utilisée pour différencier les produits chimiques classés des non-classés (voir paragraphe 36).

33. Pour les produits chimiques d'essai colorés qui ne sont pas compatibles avec la mesure de l'absorbance standard (DO) à cause de leur forte interférence avec l'essai de MTT, peuvent être évalués par une procédure de HPLC/UPLC-spectrophotométrie (voir paragraphe 34) (36). Le système HPLC/UPLC permet de séparer le formazan du produit chimique avant la quantification (36). Pour cette raison, les témoins $T_{vivants}$ NS et T_{morts} NS ne sont pas nécessaires pour la procédure HPLC/UPLC-spectrophotométrie, quel que soit le produit chimique d'essai. Les témoins MTT NS sont néanmoins nécessaires si l'on s'attend à ce que le produit chimique d'essai soit un réducteur direct du MTT, ou que la couleur empêche l'évaluation de leur potentiel de réduction directe du MTT (en suivant la procédure décrite au paragraphe 29). Lorsqu'une procédure par CLHP/CLUP-spectrophotométrie est employée pour quantifier le formazan, la viabilité tissulaire est calculée

▼M8

en pourcentage par comparaison de la surface de pic de formazan obtenue avec des tissus vivants exposés au produit chimique d'essai avec la surface de pic de formazan obtenue avec le témoin négatif parallèle. Pour les produits chimiques d'essai réducteurs directs du MTT, la viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit: %viabilité$_{test}$ moins %MTT NS. Pour finir, il convient de noter que les réducteurs directs du MTT ou les réducteurs directs du MTT causant aussi une interférence de couleurs, qui sont retenus dans les tissus après le traitement et dont la capacité de réduction du MTT est telle qu'elle conduit à des DO (pour la mesure de DO) ou à des surfaces de pic (pour la procédure CLHP/CLUP-spectrophotométrie) des extraits tissulaires testés situées en-dehors de la plage de linéarité du spectrophotomètre, ne peuvent pas être évalués; ce cas ne se présente a priori que très rarement.

34. La procédure par HPLC/UPLC-spectrophotométrie est utilisable pour mesurer le formazan pour tous les types de produits chimiques (colorés ou non, réducteurs ou non réducteurs du MTT) (36). Étant donné la diversité des équipements de HPLC/UPLC -spectrophotométrie, tous les utilisateurs ne pourront pas reproduire des conditions d'équipement identiques. Pour cette raison, preuve doit être faite de l'efficacité de l'équipement de HPLC/UPLC -spectrophotométrie avant que celui-ci ne soit utilisé pour quantifier le formazan des extraits tissulaires, en remplissant les critères d'acceptabilité pour un ensemble de paramètres normalisés de qualification inspirés des paramètres décrits dans les recommandations à l'industrie de la *Food and Drug Administration* des États-Unis sur la validation des méthodes de bio-analyse (36)(37). Ces paramètres fondamentaux et leurs critères d'acceptation sont fournis à l'appendice 4. Une fois que les critères d'acceptabilité définis à l'appendice 4 ont été remplis, l'équipement de HPLC/UPLC -spectrophotométrie est considéré comme ayant fait la preuve de son efficacité et prêt pour les mesures du formazan dans les conditions expérimentales décrites dans la présente méthode d'essai.

Critères d'acceptabilité

35. Pour chaque méthode d'essai faisant appel à des lots valables d'épiderme humain reconstitué (voir paragraphe 23), les tissus traités par le témoin négatif (TN) présentent une DO rendant compte de la qualité des tissus ayant été soumis à toutes les étapes d'expédition et de réception ainsi qu'à l'intégralité du protocole. Les valeurs de DO des témoins ne sont pas inférieures aux limites historiques. De la même façon, les résultats obtenus pour les tissus traités par le témoin positif (TP), c'est-à-dire la solution aqueuse de SDS à 5 %, rendent compte de leur capacité à réagir à un produit chimique irritant dans les conditions de la méthode d'essai (voir appendice 3 et pour plus d'information les modes opératoires standardisés des quatre modèles d'essai contenus dans cette méthode d'essai (32) (33) (34) (35). Les mesures associées et appropriées de la variabilité entre les réplicats de tissu (c'est-à-dire les écarts-types doivent normalement se situer dans les limites d'acceptation établies pour le modèle d'essai considéré (voir appendice 3).

Interprétation des résultats et modèle prédictif

36. La valeur de DO obtenue pour chaque produit chimique d'essai peut être utilisée pour calculer le pourcentage de viabilité cellulaire normalisé par rapport au témoin négatif, lequel correspond à une viabilité cellulaire arbitrairement fixée à 100 %. En cas d'utilisation de la procédure de spectrophotométrie HPLC-UPLC, la viabilité cellulaire calculée est le pourcentage de pic de MTT formazan obtenu avec les tissus vivants traités par le produit chimique d'essai par rapport au pic de MTT formazan obtenu avec le témoin négatif testé simultanément. La valeur seuil du pourcentage de viabilité cellulaire, qui établit la distinction entre les produits chimiques irritants et les produits chimiques non classés, de même que les procédures statistiques utilisées pour évaluer les résultats et identifier les produits chimiques irritants, sont clairement définies et étayées par des données. Il conviendra par ailleurs de démontrer leur pertinence (voir les modes opératoires standardisés des modèles d'essai pour information). Les valeurs seuils permettant de prédire les effets irritants sont indiquées ci-dessous:

▼M8

— Le produit chimique d'essai est identifié comme nécessitant classification et étiquetage selon le SGH de l'ONU/CLP (catégorie 1 ou catégorie 2) si le pourcentage moyen de viabilité du tissu après exposition et incubation post-traitement est inférieur ou égal (≤) à 50 %. Puisque les modèles d'essai sur épiderme humain reconstitué compris dans cette méthode d'essai ne sont pas en mesure de différencier les catégories 1 et 2 du SGH de l'ONU/CLP, de plus amples informations sur le potentiel de corrosion de la peau seront requises pour décider sur la classification finale [voir aussi le Document guide IATA (3)]. Dans le cas où le produit chimique d'essai est identifié comme non-corrosif (par exemple sur la méthode d'essai B.40, B.40 *bis* ou B.65), et montre une viabilité cellulaire après traitement, et que l'incubation post-traitement est inférieure ou égale à 50 %, le produit chimique d'essai est considéré comme irritant pour la peau, conformément avec la catégorie 2 du SGH de l'ONU/CLP.

— Selon la réglementation des pays membres, le produit chimique peut-être considéré comme non irritant pour la peau conformément à l'absence de catégorie du SGH de l'ONU/CLP si la viabilité du tissu après exposition et incubation post-traitement est supérieure (>) à 50 %.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

37. Pour chaque essai, il convient de présenter, sous forme de tableau, les résultats obtenus pour chaque réplicat de tissu (par exemple, les valeurs de DO et le pourcentage de viabilité cellulaire calculé pour chaque produit chimique d'essai, ainsi que la classification correspondante), y compris les données obtenues, le cas échéant, en reproduisant les expériences. Il conviendra en outre de préciser les valeurs moyennes ± écart-type correspondant à chaque essai. Les interactions observées avec le réactif MTT et les produits chimiques d'essai colorés seront signalées pour chaque produit chimique d'essai.

Rapport dessai

38. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Produits chimiques d'essai et produits chimiques témoins:

— substance mono-constituant: Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent;

— substance multi-constituants, UVCB ou mélange: Caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;

— apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;

— source et numéro de lot si disponible;

— traitement du produit chimique d'essai ou du produit chimique témoin avant la conduite de l'essai, s'il y a lieu (par exemple chauffage, broyage);

— stabilité du produit chimique d'essai, date de péremption, ou date de vérification analytique si disponible;

— conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Modèle d'épiderme humain reconstitué et protocole utilisés; justification de ce choix (le cas échéant)

▼**M8**

Conditions de l'essai:

— modèle d'épiderme humain reconstitué utilisé (y compris numéro de lot);

— informations d'étalonnage de l'appareil de mesure (par exemple spectrophotomètre), longueur d'onde et passe-bande (s'il y a lieu) utilisés pour quantifier le MTT formazan, et la plage de linéarité de cet appareil de mesure;

— description de la méthode utilisée pour quantifier le MTT formazan;

— description des spécifications du système de spectrophotométrie HPLC/UPLC, s'il y a lieu;

— informations complètes sur le modèle spécifique d'épiderme humain reconstitué utilisé, et notamment sur ses performances, à savoir (liste non limitative);

i) viabilité;

ii) function de barrière;

iii) morphologie;

iv) reproducibilité et capacité prédictive;

v) contrôles de qualité (CQ) du modèle;

— références des données historiques du modèle utilisé, à savoir (liste non limitative) l'acceptabilité des données de contrôle de qualité faisant référence aux données historiques du lot.

— démonstration de la compétence à exécuter la méthode d'essai, avant une utilisation régulière, au moyen des substances d'épreuve de compétence.

Protocole de l'essai:

— description détaillée des procédures appliquées, y compris les procédures de lavage utilisées après la période d'exposition

— doses de produit chimique d'essai et des produits chimiques témoins;

— durée de la ou des périodes d'exposition et température(s) d'exposition;

— indication des témoins utilisés pour les agents réducteurs directs du MTT et/ou les produits chimiques colorés, s'il y a lieu;

— nombre de réplicats de tissus utilisés par produit chimique d'essai et produit chimique témoin [témoin positif, témoin négatif et, le cas échéant, réduction non spécifique du MTT et coloration non spécifique, témoin vivant non spécifique (T_{vivant} NS), témoin mort non spécifique (T_{mort} NS)], par temps d'exposition;

— description des critères de décision/du modèle prédictif appliqués en fonction du modèle d'épiderme humain reconstitué utilisé;

— description de toute modificatin apportée au protocole d'essai (y compris aux procédures de lavage).

Critères d'acceptabilité de l'épreuve et de l'essai:

— valeur moyenne des témoins positifs et négatifs et plage d'acceptabilité par rapports aux données historiques;

▼**M8**

— variabilité acceptable entre les réplicats de tissus pour les témoins positifs et négatifs;

variabilité acceptable entre les réplicats de tissus pour le produit chimique d'essai.

— *Résultats:*

— présentation des résultats sous forme de tableau, pour chaque produit chimique d'essai et produit chimique témoin, chaque période d'exposition, chaque épreuve et chaque mesure de réplicat, y compris la densité optique ou le pic de MTT formazan, le pourcentage de viabilité cellulaire, le pourcentage moyen de viabilité cellulaire, les différences entre les réplicats, l'erreur standard et/ou le coefficient de variation s'il y a lieu;

— S'il y a lieu, les résultats des témoins utilisés pour les agents réducteurs directs du MTT et/ou les produits chimiques d'essai colorants, y compris la densité optique ou le pic de MTT formazan, % MTT NS, % T_{vivant} NS, %T_{mort} NS, les différences entre les réplicats de tissus, l'erreur standard et/ou le coefficient de variation s'il y a lieu, et le pourcentage final corrigé de viabilité cellulaire;

— description de tous autres effets observés;

— classification obtenue compte tenu du modèle prédictif/des critères de décision utilisés.

Discussion des résultats

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

(1) Nations Unies (ONU). (2013). Système Général Harmonisé de Classification et d'Etiquetage des Produits Chimiques (SGH) des Nations Unies, Cinquième Edition Révisée, ONU New York et Genève. Disponible à l'adresse: [http://www.unece.org/fr/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_f.html].

(2) EURL-ECVAM (2009). Statement on the «Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards», Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9 April 2009. Available at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf

(3) OCDE (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(4) Chapitre B.4 de la présente annexe, Effet irritant/corrosif aigu sur la peau

(5) Chapitre B.40 de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: Essai de résistance électrique transcutanée (RET).

(6) Chapitre B.40 *bis* de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: Essai sur modèle de peau humaine.

(7) Chapitre B.65 de la présente annexe, Méthode d'essai in vitro sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée.

▼**M8**

(8) OCDE (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(9) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34) Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.

(16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.

(17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α.

(18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351-358.

▼**M8**

(20) EURL-ECVAM (2007). Déclaration sur la validité des essais in vitro d'irritation cutanée, publiée par le comité consultatif scientique du l'CEVMA (ESAC26), 27 avril 2007. Disponible à l'adresse: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf

(21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *N.B. Il s'agit des normes de performances originales utilisées pour la validation de deux méthodes d'essai. Ces normes de performance ne doivent plus être utilisées puisqu'une version mise à jour (8) est désormais disponible.*

(22) EURL-ECVAM. (2008). Déclaration sur la validité scientifique des essai in vitro d'irritation cutanée, publiée par le comité consultatif scientifique du CEVMA (ESAC29), 5 novembre 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf

(23) OCDE (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol* Sci, 34, 327-334

(25) Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122

(26) OCDE (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 159), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(27) OCDE (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 155), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.

(29) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231-243.

(30) Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol*.Pharmacol. 62, 393-403).

(31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

▼**M8**

(32) EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1.8ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals

(33) EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).

(34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.

(35) LabCyte (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model «LabCyte EPI-MODEL24»

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Manuscript in preparation.

(37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Available at: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

(38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *N.B. Version des normes de performance du CEVMA mise à jour en 2009 en vue de la mise en oeuvre du SGH de l'ONU. Ces normes de performance ne doivent plus être utilisées puisqu'une version mise à jour (8) est désormais disponible pour la présente méthode d'essai.*

(40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.

(41) UE (2001). Directive 2001/59/CE de la Commission du 6 août 2001 portant vingt-huitième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses, Journal officiel L 225 de l'Union européenne, p. 1.

▼**M8**

Appendice 1

DÉFINITIONS

Précision: degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa pertinence. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de «concordance» pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (9).

Viabilité cellulaire: paramètre mesurant l'activité totale d'une population cellulaire, par exemple la capacité des déshydrogénases mitochondriales cellulaires à réduire le colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium], qui, selon l'effet mesuré et le protocole utilisé pour l'essai, est en corrélation avec le nombre total et/ou la vitalité des cellules vivantes.

Produit chimique: désigne une substance ou un mélange.

Concordance: mesure de performance pour les modèles d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories. Elle constitue un des aspects de la pertinence. Ce terme est parfois utilisé indifféremment à la place de «précision», et se définit comme la proportion de tous les produits chimiques d'essai qui ont été correctement classés comme positifs ou négatifs. La concordance dépend étroitement de la prévalence des résultats positifs dans les types de produits chimiques d'essai (9).

TE_{50}: valeur pouvant être estimée en déterminant le temps d'exposition nécessaire pour réduire la viabilité cellulaire de 50 % après application de la substance marqueur à une concentration fixe spécifiée. Voir également CI_{50}.

SGH [Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (ONU)]: système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans le but de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (1).

HPLC: Chromatographie Liquide Haute Performance.

IATA: Approches Intégrées d'Essai et d'Evaluation.

CI_{50}: valeur pouvant être estimée en déterminant la concentration d'une substance marqueur qui réduit la viabilité des tissus de 50 % (CI50) après un temps d'exposition déterminé. Voir également TE_{50}..

Dose infinie: quantité de produit chimique d'essai appliquée sur la peau qui dépasse la quantité requise pour recouvrir entièrement et uniformément la surface de l'épiderme.

Mélange: désigne un mélange ou une solution composée de deux substances ou plus.

Substance mono-constituant: une substance, définie par sa composition quantitiative, dans laquelle un des constituants principaux est présent à hauteur d'au moins 80 % (m/m).

▼**M8**

MTT: bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium; bleu de thiazol.

Substance multi-constituant: une substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant figure à une concentration supérieure ou égale à 10 % (m/m) and inférieure ou égale à 80 % (m/m). Une substance multi-constituant est le résultat d'un processus de manufacture. La différence entre un mélange et une substance multi-constituant est que le mélange est obtenu en mélangeant deux substances ou plus sans que celles-ci réagissent entre elles.. une substance multi-constituant est le résultat d'une réaction chimique.

Témoin T_{mort} NS: témoin de couleur non-spécifique dans les tissus morts.

Témoin T_{vivant} NS: témoin de couleur non-spécifique dans les tissus vivants.

MTT NS: réduction non-spécifique du MTT.

Normes de performance: normes, fondées sur une méthode d'essai validée, permettant d'évaluer la comparabilité d'une méthode d'essai proposée, structurellement et fonctionnellement similaire. Elles comprennent: (i) les éléments essentiels de la méthode d'essai, (ii) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi ceux utilisés pour démontrer les performances acceptables de la méthode d'essai validée, et (iii) les niveaux de précision et de fiabilité comparables à ceux obtenus pour la méthode d'essai validée, que la méthode d'essai proposée doit présenter lorsqu'on l'évalue à l'aide des produits chimiques de référence de la liste minimale (9).

Témoin positif: réplicat contenant tous les éléments du dispositif d'essai, traité au moyen d'un produit chimique connu pour induire une réponse positive. Afin de s'assurer que la variabilité des réponses du témoin positif peut être évaluée dans le temps, l'intensité de la réponse positive ne doit pas être excessive.

Pertinence: description de la relation entre l'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité à des fins spécifiques. Elle définit le degré auquel l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (9).

Fiabilité: mesure dans laquelle une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires (9).

Essai substitutif: essai conçu pour remplacer un essai utilisé en routine et accepté, servant à l'identification des dangers et/ou à l'évaluation de risques, et dont il a été démontré qu'il assure, par rapport à l'essai accepté, une protection équivalente ou accrue de la santé humaine ou animale ou de l'environnement, selon les cas, pour toutes les situations et produits chimiques d'essai possibles (9).

Expérience: une expérience consiste en un ou plusieurs produits chimiques d'essai simultanément avec un témoin négatif et un témoin positif, à l'aide de trois réplicats de tissus identiques.

Sensibilité: proportion des produits chimiques d'essai positifs/actifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (9).

▼**M8**

Irritation cutanée in vivo: apparition sur la peau de lésions réversibles à la suite de l'application d'un produit chimique d'essai pendant une durée pouvant aller jusqu'à quatre heures. L'irritation cutanée est une réaction locale du tissu cutané affecté qui se manifeste peu après une stimulation (38). Elle est provoquée par une réaction inflammatoire locale impliquant le système immunitaire inné (non spécifique) du tissu cutané. Elle se caractérise essentiellement par un processus réversible impliquant des réactions inflammatoires et la plupart des signes cliniques caractéristiques de l'irritation (érythème, œdème, démangeaisons et douleur) qui sont associés au processus inflammatoire.

Spécificité: proportion des produits chimiques d'essai négatifs/inactifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (9).

Substance: élément chimique et ses composés à l'état naturel ou obtenus par un processus de fabrication, y compris tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit et toute impureté résultant du processus mis en œuvre, mais à l'exclusion de tout solvant pouvant être séparé de la substance sans affecter sa stabilité ni modifier sa composition.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

UPLC: Chromatographie Liquide Haute Performance

UVCB: substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matières biologiques.

▼**M8**

Appendice 2

MODÈLES D'ESSAI INCLUS DANS CETTE MÉTHODE D'ESSAI

N°	Nom du modèle d'essai	Type d'étude de validation	Références
1	EpiSkin™	Étude de validation prospective complète (2003-2007). Les éléments de ce modèle ont servi à définir les éléments essentiels des normes de performance du CEVMA originales et actualisées (39) (40) (21) (*). De plus, c'est principalement sur la base des données de cette méthode relatives à l'identification des substances non classées vs classées qu'ont été définies les valeurs de spécificité et de sensibilité des normes de performance originales (*).	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*version originale*): au départ, ce modèle d'essai a été soumis à une étude de validation prospective complète en même temps que la méthode n°1, entre 2003 et 2007. Les éléments de ce modèle ont servi à définir les éléments essentiels des normes de performance du CEVMA, originales et actualisées (*) (39) (40) (21). **EpiDerm™ SIT (EPI-200):** une modification du modèle d'origine EpiDerm ™ a été validée en 2008 sur la base des normes de performance originales du CEVMA (*) (21) en 2008	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Étude de validation fondée sur les normes de performance originales du CEVMA (*) (22) en 2008	(2) (22) (23) (24) (29)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Étude de validation (2011-2012) basée sur les normes de performance de la LD 439 de l'OCDE (8), qui sont fondées sur les normes de performance du CEVMA mises à jour (*) (39) (40)	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40) et normes de performance de la présente LD (8) (*)

(*) Les normes de performance du CEVMA d'origine (21) ont été développées en 2007 à l'issue de l'étude de validation prospective (16) qui avait évalué les performances des modèles d'essai n°1 et 2 sur la base du système de classification de l'UE tel que décrit dans la 28e modification de la Directive sur les substances dangereuses (41). En 2008 ont été adoptés le système SGH de l'ONU (1) et le CLP de l'UE, qui ont porté de fait la valeur seuil servant à distinguer les substances non classées des substances classées d'un score *in vivo* de 2,0 à 2,3. Pour prendre en compte cette évolution des exigences réglementaires, les valeurs de précision et la liste des produits chimiques de référence des normes de performance du CEVMA ont été mises à jour en 2009 (2) (39) (40). Comme les normes de performance d'origine, les normes de performance actualisées s'appuient largement sur les données issues des modèles n°1 et 2 (16), mais elles utilisent aussi des données sur les produits chimiques de référence tirées du modèle n°3. En 2010, les normes de performance actualisées du CEVMA ont servi à définir les normes de performance relatives à la présente méthode d'essai(8). Dans le cadre de la présente méthode d'essai, EpiSkin TM est considéré comme la MRV, car ce modèle a été utilisé pour définir les critères élaborés dans les normes de performance. Le document explicatif du CEVMA/BfR accompagnant la ligne directrice 439 correspondante de l'OCDE (23) donne des informations détaillées sur les études de validation, présente une compilation des données produites ainsi que des informations contextuelles sur les adaptations à apporter aux normes de performance compte tenu de la mise en œuvre du système SGH de l'ONU/CLP.SIT: essai d'irritation cutanée (*Skin Irritation Test*)

RHE: épiderme humain reconstitué (*Reconstructed Human Epidermis*)

▼**M8**

Appendice 3

PARAMÈTRES DES PROTOCOLES SPÉCIFIQUES À CHAQUE MODÈLE D'ESSAI INCLUS DANS LA PRÉSENTE MÉTHODE D'ESSAI

Les modèles d'épiderme humain reconstitué (RhE) présentent des protocoles très similaires, utilisant notamment toutes une période post-incubation de 42 heures (32) (33) (34) (35). Les variations concernent essentiellement trois paramètres liés aux différentes fonctions de barrière des modèles d'essai, à savoir: A) temps et volume préincubation, B) application des produits chimiques d'essai et C) volume post-incubation.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Préincubation				
Temps d'incubation	18-24 heures	18-24 heures	< 2 heures	15-30 heures
Volume de milieu	2 ml	0,9 ml	3 ou 1 ml	0,5 ml
B) Application du produit chimique				
Pour les liquides	10 µl (26 µl/cm^2)	30 µl (47 µl/cm^2)	16 µl (32 µl/cm^2)	25 µl (83 µl/cm^2)
Pour les solides	10 mg (26 mg/cm^2) + ED (5 µl)	25 mg (39 mg/cm^2) + SSTPD (25µl)	16 mg (32 mg/cm^2) + ED (10 µl)	25 mg (83 mg/cm^2) + ED (25 µl)
Utilisation de tulle de nylon	pas utilisé	si nécessaire	appliqué	pas utilisé
Temps d'application total	15 minutes	60 minutes	42 minutes	15 minutes
Température d'application	TA	a) à TA pendant 25 minutes b) à 37°C pendant 35 minutes	TA	TA
C) Volume post-incubation				
Volume de milieu	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Variabilité maximale acceptable				
Écart-type entre réplicats de tissu	≤ 18	≤ 18	≤ 18	≤ 18

TA: température ambiante
ED: eau distillée
SSTPD: solution saline tamponnée au phosphate de Dulbecco

▼**M8**

Appendice 4

PRINCIPAUX PARAMÈTRES ET CRITÈRES D'ACCEPTATION DE LA PREUVE D'EFFICACITÉ D'UN SYSTÈME CLHP/CLUP-SPECTROPHOTOMÉTRIE POUR LA MESURE DU FORMAZAN EXTRAIT D'UN MODÈLE TISSULAIRE D'ÉPIDERME HUMAIN RECONSTRUIT

Paramètre	Protocole dérivé des recommandations de la FDA (29)(31)	Critères d'acceptation
Sélectivité	Analyse de l'isopropanol, du blanc vivant (extrait de modèle tissulaire d'EChR vivant sans traitement dans l'isopropanol), blanc tué (extrait de modèle tissulaire d'EChR tué sans traitement dans l'isopropanol), et d'un colorant (bleu de méthylène, par exemple)	$Surface_{interférence} \leq 20\ \%\ Surface_{VLIQ}$ [1]
Fidélité	Contrôles de qualité (c'est-à-dire, bleu de formazan à 1,6 µg/mL, 16 µg/ml et 160 µg/ml) dans l'isopropanol (n=5)	CV ≤ 15 % ou ≤ 20 % pour la VLIQ
Justesse	Contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=5)	% Écart ≤ 15 % ou ≤ 20 % pour la VLIQ
Effet de matrice	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=5)	Effet de matrice compris entre 85 % et 115 %
Effet résiduel	Analyse de l'isopropanol après une VLSQ [2] normale	$Surface_{interférence} \leq 20\ \%\ Surface_{VLIQ}$
Répétabilité (même jour)	3 courbes d'étalonnage indépendantes (établies sur la base de 6 dilutions de formazan au 1/3 consécutives dans l'isopropanol, avec point de départ VLSQ, soit 200 µg/ml); contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=5)	Courbes d'étalonnage: % Écart ≤ 15 % ou ≤ 20 % pour la VLIQ Contrôles de qualité: %Écart ≤ 15 % et CV ≤ 15 %
Reproductibilité (d'un jour à l'autre)	Jour 1: 1 courbe d'étalonnage et contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3) Jour 2: 1 courbe d'étalonnage et contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3) Jour 3: 1 courbe d'étalonnage et contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3)	
Stabilité à court terme du formazan dans un extrait tissulaire d'EChR	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=3) analysé le jour de la préparation et après une conservation de 24 heures à température ambiante	% Écart ≤ 15 %
Stabilité à long terme du formazan dans un extrait tissulaire d'EChR, si nécessaire	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=3) analysé le jour de la préparation et après une conservation de plusieurs jours à -20°C	% Écart ≤ 15 %

([1]) VLIQ: valeur limite inférieure de quantification, définie comme correspondant à une viabilité tissulaire de 1-2 %, soit 0,8 µg/ml.
([2]) VLSQ: valeur limite supérieure de quantification, définie comme au moins deux fois la concentration maximale attendue de formazan dans les extraits d'isopropanol issus des témoins négatifs (~70 µg/ml selon la MRV), soit 200 µg/ml.

▼M7

B.47. MÉTHODE D'ESSAI D'OPACITÉ ET DE PERMÉABILITÉ DE LA CORNÉE BOVINE POUR L'IDENTIFICATION DES PRODUITS CHIMIQUES I) PROVOQUANT DES LÉSIONS OCULAIRES GRAVES OU II) NE RELEVANT D'AUCUNE CLASSIFICATION POUR IRRITATION OCULAIRE OU LÉSION OCULAIRE GRAVE

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 437 (2013) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La méthode d'essai d'opacité et de perméabilité de la cornée bovine (OPCB) a été évaluée par le Comité de coordination inter-agences pour la validation des méthodes alternatives (ICCVAM) des États-Unis, en collaboration avec le Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (ECVAM) et le Centre japonais pour la validation de méthodes alternatives (JaCVAM), en 2006 et 2010 (1)(2). La première évaluation visait à déterminer l'utilité de la méthode OPCB pour identifier les produits chimiques (substances et mélanges) provoquant des lésions oculaires graves (1). La seconde évaluation a consisté à déterminer l'utilité de la méthode OPCB pour identifier les produits chimiques (substances et mélanges) non classés comme irritants pour l'œil ou provoquant de graves lésions oculaires (2). La base de données de validation OPCB contient au total 113 substances et 100 mélanges (2)(3). À l'issue de ces évaluations et de leur examen par les pairs, il a été conclu que cette méthode d'essai peut identifier correctement les produits chimiques (substances et mélanges) provoquant des lésions oculaires graves (catégorie 1) ou ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU) (4) et du règlement (CE) n° 1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (CLP) ([1]), et son utilité scientifique a donc été validée dans les deux cas. Une lésion oculaire grave est une lésion des tissus oculaires ou une dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'un produit chimique testé sur la face antérieure de l'œil, et qui n'est pas totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application. Les produits chimiques testés provoquant des lésions oculaires graves sont classées dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU. Les produits chimiques non classés comme irritants pour les yeux ou provoquant de graves lésions oculaires sont définis comme ne répondant pas aux critères de classification des catégories 1 ou 2 (2A ou 2B) du SGH de l'ONU, autrement dit, ils sont considérés comme ne relevant d'aucune catégorie du SGH de l'ONU. La présente méthode d'essai indique les applications recommandées et les limites de la méthode OPCB au regard de ces évaluations. Les principales différences entre la version originale de 2009 et la mise à jour de 2013 de la ligne directrice de l'OCDE concernent notamment: l'application de la méthode OPCB pour identifier les produits chimiques ne relevant d'aucune classification au titre du SGH de l'ONU (paragraphes 2 et 7 de la version originale); des éclaircissements sur l'applicabilité de la méthode OPCB pour tester les alcools, les cétones et les solides (paragraphes 6 et 7) ainsi que les substances et les mélanges (paragraphe 8); des éclaircissements sur la façon de tester les substances tensioactives et les mélanges contenant des tensioactifs (paragraphe 28); des mises à jour et des éclaircissements relatifs aux témoins positifs (paragraphes 39 et 40); une mise à jour des critères de décision concernant la méthode OPCB (paragraphe 47); une mise à jour des critères d'acceptation de l'étude (paragraphe 48); une mise à jour concernant les éléments du rapport d'essai (paragraphe 49); une mise à jour de l'appendice 1 sur les définitions; l'ajout de l'appendice 2 pour la valeur prédictive de la méthode d'essai OPCB dans différents système de classification; une mise à jour de l'appendice 3 sur la liste des substances d'épreuve; et une mise à jour de l'appendice 4 sur le porte-cornée pour la méthode OPCB (paragraphe 1) et sur l'opacitomètre (paragraphes 2 et 3).

([1]) Règlement (CE) n° 1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006, JO L 353 du 31.12.2008, p.1.

▼**M7**

Il est généralement admis que dans notre horizon de prévision, aucun essai unique d'irritation oculaire in vitro ne pourra remplacer le test oculaire in vivo de Draize pour établir le degré d'irritation oculaire provoqué par les différentes classes de produits chimiques. Cependant, la combinaison de plusieurs méthodes de substitution dans le cadre d'une stratégie d'essais (à plusieurs niveaux) pourrait remplacer le test oculaire de Draize (5). L'approche «top-down» (5) est indiquée lorsque, d'après les informations existantes, on s'attend à ce qu'un produit chimique soit fortement irritant, alors que l'approche «bottom-up» (5) est conçue pour être appliquée quand, au vu des informations existantes, un produit chimique devrait a priori ne causer aucune irritation oculaire suffisante pour nécessiter une classification. La méthode OPCB est une méthode d'essai in vitro pouvant être utilisée, dans certaines circonstances et compte tenu de ses limites particulières, pour classer et étiqueter les produits chimiques en fonction de leur caractère dangereux pour l'œil. Alors qu'elle n'est pas jugée valable pour remplacer purement et simplement la méthode d'essai in vivo sur les yeux de lapin, la méthode OPCB est recommandée comme première étape d'une stratégie d'essai telle que l'approche «top-down» suggérée par Scott et al. (5) pour identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves, à savoir les produits relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU, sans expérience supplémentaire (4). La méthode OPCB est aussi recommandée pour identifier les produits chimiques ne nécessitant aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, ainsi que le définit le SGH de l'ONU («sans catégorie») (4) dans le cadre d'une stratégie d'essai telle que l'approche «bottom-up» (5). Cependant, un produit chimique qui, avec la méthode OPCB, semble ne causer aucune lésion oculaire grave ou ne relever d'aucune classification pour irritation oculaire/lésion oculaire grave nécessiterait d'être soumis à des essais complémentaires (in vitro et/ou in vivo) pour établir une classification définitive.

L'objet de la présente méthode d'essai est de décrire les procédures utilisées pour évaluer le danger potentiel d'un produit chimique testé pour l'œil, mesuré par la propension du produit chimique à provoquer une opacité et une perméabilité accrue sur une cornée bovine isolée. Les effets toxiques pour la cornée sont mesurés par: (i) la diminution de la capacité de transmission de la lumière (opacité); et (ii) l'augmentation du passage de la fluorescéine sodique (perméabilité). Les mesures de l'opacité et de la perméabilité de la cornée suite à son exposition au produit chimique testé sont ensuite combinées pour établir le score d'irritation in vitro (SIIV), utilisé pour classer le produit chimique testé en fonction de son pouvoir irritant.

Les définitions des termes utilisés sont données à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

La présente méthode d'essai est fondée sur le protocole expérimental de la méthode OPCB de l'ICCVAM (6)(7), élaboré à l'origine à partir des informations provenant du protocole de l'Institute for in vitro Sciences (IIVS) et sur le protocole INVITTOX n° 124 (8). Ce dernier protocole a été utilisé lors de l'étude de pré-validation conduite en 1997-1998 sous l'égide de la Communauté européenne. Ces protocoles étaient tous deux fondés sur la méthode d'essai OPCB décrite pour la première fois par Gautheron et al. (9).

La méthode OPCB peut être utilisée pour identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves, selon la définition du SGH de l'ONU, à savoir les produits chimiques relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU (4). Appliquée dans ce cadre, la méthode d'essai OPCB présente une précision globale de 79 % (150/191), un taux de faux positifs de 25 % (32/126) et un taux de faux négatifs de 14 % (9/65), en comparaison avec les données de la méthode d'essai sur œil de lapin in vivo, classés selon le système de classification du SGH de l'ONU (3) (voir appendice 2, tableau 1). Si l'on exclut de la base de données les produits chimiques testés relevant de certaines classes chimiques (alcools, cétones) ou physiques (matières solides), la précision de la méthode OPCB au regard du système de classification du SGH de l'ONU est de 85 % (111/131), le taux de faux positifs de 20 % (16/81), et le taux de faux négatifs de 8 % (4/50). Les limites potentielles de la méthode OPCB pour identifier les produits

▼M7

chimiques provoquant des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU) concernent le taux élevé de faux positifs pour les alcools et les cétones, et le taux élevé de faux négatifs pour les substances solides, relevés dans la base de données de validation (1)(2)(3). Toutefois, tous les alcools et cétones n'étant pas surévalués par la méthode OPCB et certains étant correctement identifiés comme relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU, on ne considère pas que ces deux groupes fonctionnels organiques sortent du champ d'application de la méthode d'essai. Il appartient à l'utilisateur appliquant cette méthode d'essai de décider si une surévaluation possible d'un alcool ou cétone est acceptable ou s'il est nécessaire de réaliser des tests complémentaires fondés sur une analyse du poids de la preuve. Concernant les taux de faux négatifs pour les solides, il convient de relever que les solides peuvent entraîner des conditions d'exposition variables et extrêmes lors du test d'irritation oculaire in vivo de Draize, ce qui peut fausser la prédiction de leur véritable potentiel d'irritation (10). Il convient également de noter qu'aucun des faux négatifs identifiés dans la base de données de validation de l'ICCVAM (2)(3), lors de l'identification de produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU), n'a produit un SIIV $\leq$ 3, soit le critère utilisé pour identifier un produit chimique testé ne relevant d'aucun catégorie du SGH de l'ONU. De plus, les faux négatifs obtenus avec la méthode OPCB dans ce contexte ne sont pas préoccupants car tous les produits chimiques testés qui produisent un SIIV > 3 et $\leq$ 55 feraient ensuite l'objet d'autres essais in vitro dûment validés, ou en dernier recours d'essais chez le lapin, en fonction des exigences de la réglementation, selon une démarche expérimentale séquentielle fondée sur l'analyse du poids de la preuve. Certains produits chimiques solides étant correctement identifiés avec la méthode OPCB comme relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU, on ne considère pas non plus que cet état physique sorte du champ d'application de la méthode d'essai. Les chercheurs peuvent envisager d'utiliser cette méthode d'essai pour tous les types de produits chimiques, à condition d'admettre qu'un SIIV > 55 indique un effet provoquant des lésions oculaires graves et de classer le produit chimique testé dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU sans mener d'essai complémentaire. Comme mentionné précédemment, il convient toutefois d'interpréter avec prudence les résultats positifs obtenus avec des alcools ou des cétones en raison du risque de surestimation.

La méthode OPCB peut aussi être utilisée pour identifier les produits chimiques qui ne nécessitent aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave suivant le système de classification du SGH de l'ONU (4). Appliquée dans ce cadre, la méthode d'essai OPCB présente une précision d'ensemble de 69 % (135/196), un taux de faux positifs de 69 % (61/89) et un taux de faux négatifs de 0 % (0/107), en comparaison avec les données de la méthode d'essai in vivo sur les yeux de lapin classées selon le système de classification du SGH de l'ONU (3) (voir appendice II, tableau 2). Le taux de faux positifs obtenu (produits chimiques ne relevant d'aucune catégorie du SGH de l'ONU in vivo produisant un SIIV > 3, voir paragraphe 47) est considérablement élevé, mais pas préoccupant dans ce contexte car tous les produits chimiques testés qui produisent un SIIV > 3 et $\leq$ 55 feraient ensuite l'objet d'autres essais in vitro dûment validés, ou en dernier recours d'essais chez le lapin, en fonction des exigences de la réglementation, selon une démarche expérimentale séquentielle fondée sur l'analyse du poids de la preuve. La méthode OPCB ne montre aucune limite spécifique pour tester les alcools, les cétones et les solides quand l'objectif est d'identifier les produits chimiques qui ne nécessitent aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave («sans catégorie» du SGH de l'ONU) (3). Les chercheurs peuvent envisager d'utiliser cette méthode d'essai pour tous les types de produits chimiques, à condition d'admettre qu'un résultat négatif (SIIV $\leq$ 3) indique qu'aucune classification n'est requise («sans catégorie» du SGH de l'ONU). La méthode OPCB ne parvenant à identifier correctement que 31 % des produits chimiques ne nécessitant aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, cette méthode d'essai ne doit pas être privilégiée pour lancer une approche «bottom-up» (5), si d'autres méthodes in vitro validées et acceptées avec une sensibilité élevée similaire mais une spécificité supérieure sont possibles.

▼M7

La base de données de validation OPCB contient au total 113 substances et 100 mélanges (2)(3). La méthode OPCB semble donc pouvoir s'appliquer aux essais des substances et des mélanges.

La méthode OPCB n'est pas recommandée pour identifier les produits chimiques testés qui devraient être classés comme irritants pour l'œil (catégorie 2 ou catégorie 2A du SGH de l'ONU) ou les produits chimiques testés qui devraient être classés comme légèrement irritants pour l'œil (catégorie 2B du SGH de l'ONU) en raison du nombre considérable de produits chimiques de la catégorie 1 du SGH de l'ONU sous-classés dans les catégories 2, 2A ou 2B, du SGH de l'ONU et de produits chimiques ne relevant d'aucune catégorie du SGH de l'ONU surclassés dans les catégories 2, 2A ou 2B du SGH de l'ONU (2)(3). Aussi pourrait-il être nécessaire de mener des essais complémentaires avec une autre méthode adaptée.

Tous les modes opératoires sur l'œil de bovin doivent respecter les réglementations applicables aux installations d'essai et les protocoles de manipulation de matériaux issus de l'homme et de l'animal, comprenant notamment, sans s'y limiter, les tissus et les fluides tissulaires. L'usage des précautions universelles de laboratoire est recommandé (11).

Bien que la méthode OPCB ne prenne pas en considération les lésions conjonctivales et iridiennes, elle prend en compte les lésions cornéennes, qui sont le facteur principal dans la classification selon les effets in vivo, dans le cadre d'application du SGH de l'ONU. La réversibilité des lésions cornéennes ne peut pas, par définition, être évaluée avec la méthode OPCB. Il a été proposé, sur la base d'études menées sur l'œil de lapin, qu'une évaluation de la profondeur initiale de la lésion cornéenne puisse être utilisée pour distinguer les effets réversibles des effets irréversibles (12). Cependant, des connaissances scientifiques approfondies seront nécessaires pour comprendre comment les effets irréversibles qui ne sont pas liés à une lésion initiale importante peuvent survenir. Enfin, la méthode OPCB ne permet pas d'évaluer la toxicité systémique potentielle associée à l'exposition oculaire.

La présente méthode d'essai sera mise à jour régulièrement, à mesure que de nouvelles informations et données seront examinées. Ainsi, l'histopathologie peut s'avérer utile lorsqu'une caractérisation plus complète de la lésion cornéenne est nécessaire. Comme indiqué dans le Document d'orientation no. 160 (13), les utilisateurs sont encouragés à conserver les cornées et à préparer des spécimens histopathologiques en vue d'établir une base de données et de définir des critères de décision susceptibles d'améliorer la précision de cette méthode d'essai.

Pour tout laboratoire mettant en œuvre la méthode d'essai pour la première fois, la liste des produits chimiques d'épreuve de compétence est fournie à l'appendice 3. Un laboratoire peut utiliser ces produits chimiques afin de démontrer sa compétence technique dans la conduite de l'essai OPCB avant de soumettre des données résultant de l'application de la méthode OPCB à des fins réglementaires de classification des dangers.

PRINCIPE DE L'ESSAI

La méthode d'essai OPCB est un modèle organotypique qui permet de maintenir in vitro les fonctions physiologiques et biochimiques normales de la cornée bovine pendant une courte période. Selon cette méthode, les dommages causés par le produit chimique testé sont évalués par des mesures quantitatives des modifications de l'opacité et de la perméabilité de la cornée réalisées, respectivement, à l'aide d'un opacitomètre et d'un spectrophotomètre visible. Ces deux mesures entrent dans le calcul de l'IVIS, valeur utilisée pour assigner une catégorie de classification de danger d'irritation in vitro permettant d'estimer le potentiel d'irritation oculaire in vivo d'un produit chimique testé (voir «Critères de décision» au paragraphe 48).

La méthode d'essai OPCB utilise des cornées isolées provenant d'yeux de bovins récemment abattus. L'opacité cornéenne est mesurée par la quantité de lumière traversant la cornée. La perméabilité est mesurée par la quantité de fluorescéine sodique traversant toute l'épaisseur de la cornée, et détectée dans le milieu de la chambre postérieure. Les produits chimiques testés sont appliqués sur la surface

▼M7

épithéliale de la cornée en étant ajoutés dans la chambre antérieure du porte-cornée. L'appendice 4 présente une description et un schéma de porte-cornée utilisé dans la méthode OPCB. Ces appareils sont disponibles dans le commerce auprès de différents fabricants, ou peuvent être construits.

Provenance et âge des yeux de bovins et sélection des espèces animales

Les bovins envoyés à l'abattoir sont généralement destinés à la consommation humaine ou à d'autres usages commerciaux. Seules les cornées de bêtes en bonne santé, considérées comme propres à intégrer la chaîne alimentaire humaine, sont prélevées pour la méthode OPCB. Le poids des bovins variant considérablement en fonction de la race, de l'âge et du sexe, il n'existe aucune recommandation spécifique en la matière au moment de l'abattage.

L'utilisation d'yeux provenant d'animaux d'âges différents peut entraîner des variations de dimension des cornées. Les cornées dont le diamètre horizontal est supérieur à 30,5 mm et l'épaisseur cornéenne centrale (ECC) supérieure ou égale à 1 100 μm ont généralement été prélevées sur des bovins de plus de huit ans, tandis que les cornées ayant un diamètre horizontal inférieur à 28,5 mm et une ECC inférieure à 900 μm proviennent plutôt de bêtes de moins de cinq ans (14). En conséquence, les yeux des bovins âgés de plus de 60 mois ne sont généralement pas utilisés. En général, les yeux des bovins de moins de 12 mois ne sont pas non plus utilisés, car leur développement n'est pas terminé et l'épaisseur ainsi que le diamètre cornéen sont nettement inférieurs à ceux des yeux provenant de bovins adultes. Toutefois, les cornées issues d'animaux jeunes (entre 6 et 12 mois) sont acceptables car elles présentent certains avantages, tels qu'une plus grande disponibilité, une fourchette d'âge plus restreinte, et des risques moins importants d'exposition potentielle à l'encéphalopathie spongiforme bovine (15) pour le personnel. Une évaluation plus poussée des effets de la taille ou de l'épaisseur cornéenne sur la sensibilité aux produits chimiques corrosifs et irritants serait d'une grande utilité, aussi les utilisateurs sont-ils encouragés à consigner l'âge et/ou le poids estimés des animaux ayant fourni les cornées utilisées dans l'étude.

Collecte et transport des yeux jusqu'au laboratoire

Les yeux sont prélevés par les employés des abattoirs. Afin de limiter le plus possible tout endommagement, mécanique ou autre, des yeux, ceux-ci doivent être énucléés dès que possible après la mort de l'animal et immédiatement refroidies après énucléation et pendant le transport. Pour éviter d'exposer les yeux à des produits chimiques potentiellement irritants, les employés de l'abattoir ne doivent pas utiliser de détergent lors du rinçage de la tête de l'animal.

Les yeux doivent être totalement immergés dans une solution froide saline équilibrée de Hank (HBSS), dans un récipient de taille adaptée, et transportés jusqu'au laboratoire en ayant soin de limiter le plus possible tout endommagement et/ou contamination bactérienne. Les yeux étant prélevés au cours de l'abattage, ils risquent d'entrer en contact avec du sang ou d'autres matières biologiques, notamment des bactéries ou autres microorganismes. Il importe donc de réduire au minimum le risque de contamination (par exemple en plaçant le récipient contenant les yeux sur de la glace mouillée, pendant la collecte et le transport, ou en ajoutant des antibiotiques à la HBSS utilisée pour le transport [100 UI/ml de pénicilline et 100 μg/ml de streptomycine, par exemple]).

Il faut limiter au maximum l'intervalle de temps entre le prélèvement des yeux et l'utilisation des cornées dans le cadre de l'essai OPCB (l'utilisation doit avoir lieu le jour même du prélèvement) et démontrer qu'il ne compromet pas les résultats de l'essai. Ces résultats se fondent sur les critères de sélection des yeux, ainsi que sur les réponses des témoins positifs et négatifs. Tous les yeux utilisés au cours de l'essai doivent provenir d'un lot d'yeux collectés le même jour.

Critères de sélection des yeux utilisés pour la méthode OPCB

Une fois parvenus au laboratoire, les yeux sont examinés avec soin pour déceler d'éventuels défauts, tels qu'une opacité avancée, des éraflures ou une néovascularisation. Seules les cornées d'yeux exempts de tout défaut seront utilisées.

▼M7

La qualité de chaque cornée est également évaluée à des stades ultérieurs de l'essai. Les cornées présentant une opacité supérieure à sept unités d'opacité ou l'équivalent pour l'opacitomètre et le porte-cornée utilisés après une période initiale d'équilibration d'une heure doivent être écartées (NB: l'opacitomètre doit être étalonné en fonction des normes d'opacité utilisées pour définir les unités d'opacité, voir appendice 4).

Chaque groupe de traitement (produit chimique testé et témoins négatifs et positifs) est composé de trois yeux au minimum. L'essai OPCB nécessite trois cornées servant de témoins négatifs. Toutes les cornées étant prélevées sur le globe oculaire entier puis placées dans les chambres du porte-cornée, les manipulations peuvent entraîner d'éventuels artefacts sur les valeurs de l'opacité et de la perméabilité cornéennes de chaque élément (y compris le témoin négatif). Par ailleurs, les valeurs d'opacité et de perméabilité mesurées sur les cornées témoins négatives servent à corriger les valeurs d'opacité et de perméabilité cornéennes des spécimens et des témoins traités positifs lors du calcul du score d'irritation in vitro.

MODE OPERATOIRE

Préparation des yeux

Des cornées exemptes de tout défaut sont découpées en conservant un rebord de 2 à 3 mm de sclère destiné à faciliter les manipulations ultérieures, et en prenant soin de ne pas endommager l'épithélium et l'endothélium cornéens. Les cornées isolées sont placées dans des porte-cornées spécialement conçus à cet effet, qui se composent de deux compartiments, antérieur et postérieur, respectivement en contact avec les faces épithéliale et endothéliale de la cornée. Il convient de remplir jusqu'à débordement ces deux chambres d'un milieu essentiel minimum de Eagle (MEME) préalablement chauffé et ne contenant pas de phénol rouge (en commençant par la chambre postérieure), en évitant toute formation de bulles d'air. L'appareil est ensuite équilibré à une température de 32 ± 1°C pendant une heure au moins, afin que les cornées s'équilibrent avec le milieu et atteignent une activité métabolique aussi proche de la normale que possible (la température de la surface cornéenne in vivo est d'environ 32°C).

Après la période d'équilibration, un nouveau MEME préalablement chauffé et ne contenant pas de phénol rouge est ajouté dans les deux chambres, et une première mesure d'opacité est effectuée pour chaque cornée. Les cornées présentant une altération macroscopique des tissus (éraflures, pigmentation ou néovascularisation, par exemple) ou une opacité supérieure à 7 unités d'opacité, ou l'équivalent pour l'opacitomètre et le porte-cornée utilisé, sont écartées. Au moins trois cornées sont sélectionnées pour servir de témoins négatifs (ou témoins de solvant). Les cornées restantes sont ensuite réparties entre le groupe de traitement et celui des témoins positifs.

La capacité calorifique de l'eau étant supérieure à celle de l'air, l'eau procure des conditions de température plus stables pour l'incubation. Aussi est-il recommandé de plonger le porte-cornée dans un bain d'eau pour maintenir son contenu à 32 ± 1°C. Toutefois, il est également possible d'utiliser des incubateurs à air, à condition d'assurer la stabilité de la température (en chauffant au préalable les porte-cornées et les milieux, par exemple).

Application du produit chimique testé

Deux protocoles d'application différents sont utilisés, l'un pour les liquides et les tensioactifs (solides ou liquides), et l'autre pour les solides non tensioactifs.

Les liquides sont testés non dilués. Les semi-solides, les crèmes et les cires sont typiquement testés comme les liquides. Les tensioactifs sont testés à une concentration de 10 % en masse volumique dans une solution de chlorure de sodium 0.9 %, d'eau distillée ou d'un autre solvant dont l'absence d'effets indésirables sur le système d'essai a été démontrée. Il conviendra de justifier de façon idoine

▼M7

l'utilisation de tout autre taux de concentration. Les mélanges contenant des tensioactifs peuvent être testés sans être dilués ou dilués à une concentration adéquate en fonction de la situation d'exposition in vivo. Il conviendra de justifier de façon idoine la concentration utilisée. Les cornées sont ensuite exposées aux liquides ou tensioactifs pendant 10 minutes. L'utilisation d'une autre durée d'exposition devra être scientifiquement justifiée. Il convient de se rapporter à l'appendice 1 pour la définition d'un tensioactif et d'un mélange contenant des tensioactifs.

Les solides non tensioactifs sont généralement testés sous forme de solutions ou de suspensions à une concentration poids/volume de 20 % dans une solution de chlorure de sodium 0,9 %, d'eau distillée ou d'un autre solvant dont l'absence d'effets indésirables sur le système d'essai a été démontrée. Dans certaines circonstances et uniquement si cela est justifié scientifiquement, les solides peuvent aussi être testés purs par application directe sur la surface cornéenne, selon la méthode en chambre ouverte (voir paragraphe 32). Les cornées sont exposées aux solides pendant quatre heures, mais comme pour les liquides et les tensioactifs, des durées d'exposition différentes sont possibles moyennant une justification scientifique appropriée.

Différentes méthodes d'application peuvent être utilisées, en fonction de la nature physique et des caractéristiques chimiques des produits chimiques testés (solides, liquides, liquides visqueux ou non visqueux, par exemple). Il est très important que le produit chimique testé recouvre convenablement la surface épithéliale puis soit correctement retirée durant les étapes de rinçage. Il conviendra généralement d'utiliser la méthode en chambre fermée pour les produits chimiques testés liquides non visqueux ou légèrement visqueux, tandis que la méthode en chambre ouverte sera privilégiée pour les produits chimiques testés semi-visqueux et visqueux et pour les solides purs.

Dans la méthode en chambre fermée, une quantité de produit chimique testé suffisante pour recouvrir la face épithéliale de la cornée (750 µl) est introduite dans la chambre antérieure par les trous de dosage situés sur la face supérieure de celle-ci. Les trous sont ensuite occultés à l'aide de capuchons durant la durée d'exposition. Il importe de s'assurer que chaque cornée est exposée à un produit chimique testé pendant la durée qui convient.

Dans la méthode en chambre ouverte, la goupille de fermeture et la fenêtre en verre de la chambre antérieure sont retirés avant l'application. Le produit chimique testé ou témoin (750 µl, ou une quantité suffisante pour recouvrir entièrement la cornée) est directement appliqué sur la surface épithéliale cornéenne à l'aide d'une micropipette. Si le produit chimique testé est difficile à pipeter, il est possible d'utiliser une pipette à déplacement positif qui permet un dosage plus précis. L'embout de la pipette à déplacement positif est inséré dans l'embout distributeur de la seringue de manière à ce que le produit chimique testé puisse être chargé dans la pipette sous pression. Il convient ensuite de pousser le piston de la seringue tout en tirant simultanément celui de la pipette. Si des bulles d'air se forment dans l'embout de la pipette, il faut alors retirer le produit chimique testé (en l'expulsant) et répéter le processus jusqu'à ce qu'aucune bulle d'air n'apparaisse au moment du remplissage de la pipette. Il est possible d'utiliser si nécessaire une seringue normale (sans aiguille), ce qui permet de mesurer un volume précis de produit chimique testé et de l'appliquer plus facilement sur la surface épithéliale de la cornée. Après le dosage, la fenêtre en verre est replacée sur l'ouverture de la chambre antérieure afin de recréer un système fermé.

Incubation post-exposition

Après la période d'exposition, le produit chimique testé, ou le produit chimique témoin négatif ou positif, est retiré de la chambre antérieure et l'épithélium est rincé au moins trois fois (ou jusqu'à ce qu'aucune trace du produit chimique testé ne soit plus visible) au moyen d'un MEME contenant du rouge de phénol. Le rinçage est effectué à l'aide d'un milieu contenant du rouge de phénol, dont le changement de couleur permet de déterminer l'efficacité du rinçage des produits chimiques d'essai acides ou alcalins. Il convient de laver à nouveau les cornées si, après trois rinçages, le rouge de phénol est encore altéré (jaune ou violet) ou si

▼M7

le produit chimique testé est toujours visible. Une fois le milieu débarrassé du produit chimique testé, les cornées subissent un dernier rinçage avec un MEME sans rouge de phénol, ce qui permet de s'assurer que la chambre antérieure est débarrassée de tout rouge de phénol avant la mesure d'opacité. La chambre antérieure est ensuite à nouveau remplie d'un MEME neuf sans rouge de phénol.

Pour les liquides et les tensioactifs, les cornées sont incubées après rinçage pendant deux heures supplémentaires à 32 ± 1°C. Il peut être utile, dans certaines circonstances (déterminées au cas par cas), de prévoir une durée d'incubation post-exposition plus longue. Les cornées sur lesquelles des solides ont été appliqués sont soigneusement rincées après une période d'exposition de quatre heures, et ne requièrent pas d'incubation supplémentaire.

Au terme de la période d'incubation post-exposition pour les liquides et les tensioactifs, et au terme de la période d'exposition de quatre heures pour les solides non tensioactifs, le degré d'opacité et de perméabilité de chaque cornée est enregistré. En outre, chaque cornée est observée visuellement et des commentaires pertinents sont consignés (exfoliation des tissus, résidus de produit chimique testé ou opacité non uniforme, par exemple). Ces observations peuvent s'avérer importantes car elles peuvent être reflétées par des variations de lecture de l'opacitomètre.

Produits chimiques témoins

Des témoins négatifs ou des témoins de solvant/véhicule ainsi que des témoins positifs doivent être inclus en parallèle dans chaque expérience.

Lorsqu'une substance liquide non diluée est soumise à l'essai, il convient d'inclure dans la méthode d'essai OPCB une substance témoin négatif concurrente (solution de chlorure de sodium 0.9 % ou eau distillée, par exemple) afin de détecter des changements non intrinsèques au système d'essai et de fournir un point de référence pour les critères d'évaluation de l'essai. Cette méthode permet également de garantir que les conditions de l'essai n'entraînent aucune réaction d'irritation indésirable.

Lorsqu'un liquide dilué, un tensioactif ou un solide est soumis à l'essai, il convient d'inclure dans la méthode d'essai OPCB un groupe témoin de solvant/véhicule concurrent afin de détecter des changements non intrinsèques au système d'essai et de fournir un point de référence pour les critères d'efficacité de l'essai. On utilisera uniquement des solvants/véhicules dont l'absence d'effets indésirables sur le système d'essai a été démontrée.

Un produit chimique reconnu pour générer une réponse positive est inclus dans chaque expérience afin de vérifier l'intégrité du dispositif d'essai et de son bon fonctionnement. Cependant, afin de pouvoir évaluer la variabilité des réponses du témoin positif dans le temps, l'ampleur des effets irritants ne devra pas être excessive.

Pour les produits chimiques liquides, les témoins positifs peuvent être composés de 100 % d'éthanol ou de 100 % de diméthylformamide. Pour les produits chimiques solides, les témoins positifs peuvent être composés d'imidazole à 20 % (en masse volumique) dans une solution de chlorure de sodium 0,9 %, par exemple.

Des produits chimiques étalons peuvent s'avérer utiles pour évaluer le potentiel d'irritation oculaire de produits chimiques inconnus relevant de classes spécifiques de substances chimiques ou de produits, ou encore pour évaluer le potentiel d'irritation relatif d'un irritant oculaire dans une gamme spécifique de réactions d'irritation.

Effets mesurés

L'opacité est déterminée par la quantité de lumière traversant la cornée. L'opacité de la cornée est mesurée de manière quantitative à l'aide d'un opacitomètre, qui donne des valeurs d'opacité situées sur une échelle continue.

La perméabilité est déterminée par la quantité de fluorescéine sodique pénétrant la totalité des couches cellulaires de la cornée (de l'épithélium sur la surface externe de la cornée à l'endothélium sur sa surface interne). Un volume de 1 ml de solution de fluorescéine sodique (respectivement 4 ou 5 mg/ml lors d'essais portant sur des liquides et des tensioactifs ou sur des solides non tensioactifs) est introduit dans la chambre antérieure du porte-cornée, en contact avec la face épithéliale de la cornée, tandis que la chambre postérieure,

▼M7

en contact avec la face endothéliale, est remplie d'un nouveau MEME. Le porte-cornée est ensuite incubé en position horizontale pendant 90 ± 5 min à une température de 32 ± 1°C. La quantité de fluorescéine sodique passant dans la chambre postérieure est mesurée quantitativement par spectrophotométrie UV-visible. Les mesures spectrophotométriques évaluées à 490 nm sont enregistrées en tant que valeurs de densité optique (DO_{490}) ou d'absorbance, mesurées sur une échelle continue. La perméabilité de la fluorescéine est déterminée à l'aide des valeurs de DO_{490} données par un spectrophotomètre visible utilisant un trajet optique standard de 1 cm.

Il est également possible d'utiliser un lecteur de plaques de microtitration 96 puits, à condition: (i) de pouvoir définir l'intervalle linéaire du lecteur de plaque servant à déterminer les valeurs de la DO_{490} par la fluorescéine; et (ii) d'utiliser le bon volume d'échantillons de fluorescéine sur la plaque 96 puits afin d'obtenir des valeurs de la DO_{490} équivalentes au trajet optique standard de 1 cm (ce qui peut nécessiter de remplir entièrement les puits [généralement 360 µl]).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation des données

Une fois que les valeurs d'opacité et de perméabilité moyenne (DO_{490}) ont été corrigées de l'opacité de fond et des valeurs DO_{490} de perméabilité des témoins négatifs, l'opacité moyenne et les valeurs DO_{490} de perméabilité pour chaque groupe de traitement doivent être combinées dans une formule dérivée empiriquement pour calculer comme suit le score in vitro (IVIS) de chaque groupe de traitement:

IVIS = valeur moyenne d'opacité + (15 × valeur DO_{490} moyenne de perméabilité)

D'après Sina et al. (16), cette formule a été dérivée au cours d'études internes et inter-laboratoires. Les données générées pour une série de 36 composés dans le cadre d'une étude inter-laboratoires ont été soumises à une analyse à variables multiples afin de déterminer l'équation du meilleur ajustement entre les données in vivo et in vitro. Des scientifiques travaillant dans deux entreprises distinctes ont effectué cette analyse et ont dérivé des équations pratiquement identiques.

Les valeurs d'opacité et de perméabilité doivent également être évaluées de manière indépendante afin de déterminer si un produit chimique testé a provoqué une corrosion ou une forte irritation pour un seul des deux paramètres (voir «Critères de décision»).

Critères de décision

Les valeurs critiques déterminante pour l'identification des produits chimiques induisant des lésions oculaires graves pour l'œil (catégorie 1 de SGH de l'O.N.U.) par rapport aux produits chimiques ne nécessitant pas de classifications pour l'irritation oculaire ou pour les dommages lésions oculaires graves (ne relevant d'aucune catégorie selon le SGH de l'O.N.U.) sont fournies ci-dessous:

IVIS	SGH de l'O.N.U.
≤ 3	Sans catégorie
> 3; ≤ 55	Aucune prédiction ne peut être faite
> 55	Catégorie 1

Critères d'acceptation de l'étude

Un essai est considéré comme acceptable si le témoin positif présente un IVIS compris dans un intervalle de deux écarts-types autour de la moyenne historique actuelle, qui doit être mise à jour au moins tous les trois mois, ou à chaque fois qu'un essai acceptable est mené dans des laboratoires conduisant peu fréquemment (c'est-à-dire moins d'une fois par mois) ce type d'étude. Les réponses du témoin négatif ou du témoin de solvant/véhicule doivent donner des valeurs d'opacité et de perméabilité situées en-deçà des limites maximales établies pour les valeurs d'opacité et de perméabilité de fond des cornées bovines traitées avec les témoins négatifs ou les témoins de solvant/véhicule correspondants. Une seule

▼M7

expérience composée d'au moins trois cornées doit être suffisante pour tester un produit chimique quand la classification résultante est sans équivoque. Cependant, dans le cas de résultats équivoques dans la première expérience, une seconde expérience devrait être considérer (mais pas nécessairement requise), ainsi qu'une troisième tentative dans le cas de résultats IVIS moyens discordants entre les deux premières expériences. Dans ce contexte, un résultat en première tentative est considéré comme équivoque si les prédictions résultant des trois cornées ne sont pas concordantes, comme suit:

— Deux des trois cornées ont donné des prédictions discordantes par rapport à la moyenne des trois cornées, ou

— Une des trois cornées a donné une prédiction discordante de la moyenne des trois cornées, et le résultat discordant était supérieur à 10 unités IVIS de la valeur critique de 55.

— Si la répétition de l'expérience corrobore la prédiction de l'expérience initiale (sur la base de la valeur moyenne IVIS), alors la décision finale peut être prise sans expérience supplémentaire. Si la répétition de l'expérience fournit une prédiction discordante par rapport à la première expérience, (sur la base de la valeur moyenne IVIS), alors une troisième et dernière expérience devrait être menée pour résoudre les prédictions équivoques, et ainsi permettre de classé le produit chimique. Il peut être accordé de ne pas faire d'expérience supplémentaire pour la classification et l'étiquetage dans le cas où l'expérience résulte en une prédiction de catégorie 1 du SGH de l'O.N.U.

Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes, dès lors qu'elles s'appliquent à l'étude:

Produit chimique testé et témoins

— nom(s) chimique(s), par exemple nom de la structure chimique utilisé par le Chemical Abstracts Service (CAS), suivi d'autres noms, s'ils sont connus; le numéro d'enregistrement CAS (CASRN), s'il est connu;

— pureté et composition du produit chimique testé ou de la préparation et des produits chimiques témoins [en pourcentage(s) par unité de poids], dans la mesure où cette information est disponible;

— propriétés physico-chimiques (telles que l'état physique, la volatilité, le pH, la stabilité, la classe chimique, l'hydrosolubilité) utiles pour la conduite de l'étude;

— le cas échéant, traitement des produits chimiques testés/témoins avant l'essai (par exemple, chauffage, broyage);

— stabilité (si elle est connue).

Renseignements relatifs au donneur d'ordre et à l'installation d'essai

— nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude.

Conditions d'application de la méthode d'essai

— opacitomètre utilisé (par ex., modèle et spécifications) et réglages de l'instrument;

— informations concernant l'étalonnage des appareils de mesure de l'opacité et de la perméabilité (p. ex. opacitomètre et spectrophotomètre) pour assurer la linéarité des mesures;

— type de porte-cornée utilisé (p.ex. modèle et spécifications);

▼**M7**

— description des autres appareils utilisés;

— procédure utilisée pour garantir l'intégrité (c'est-à-dire la précision et la fiabilité) de la méthode d'essai sur la durée (par ex., essais périodiques de substances d'épreuve des compétences, utilisation de données historiques sur les témoins négatifs et positifs).

Critères d'acceptabilité de l'essai

— intervalles de valeurs acceptables pour les témoins positifs et négatifs concurrents, d'après les données historiques;

— le cas échéant, intervalles de valeurs acceptables pour les témoins étalons concurrents, d'après les données historiques.

Collecte des yeux et préparation

— identification de la source d'obtention des yeux (c'est-à-dire l'établissement fournisseur des yeux)

— diamètre des cornées afin d'établir l'âge des animaux et de justifier leur utilisation dans cet essai;

— Stockage et conditions de transport des yeux p.ex. date et heure de la collecte, intervalle de temps avant le début de l'essai, milieu de transport et conditions de température, utilisation d'antibiotiques le cas échéant;

— préparation et montage des cornées bovines, remarques concernant leur qualité; températures des porte-cornée, et critères d'utilisation pour la conduite de l'essai

Procédure de l'essai

— nombre de réplicats utilisés;

— identité des témoins positif(s) et négatif(s) utilisés (le cas échéant le solvant utilisé et les produits chimiques de référence);

— concentration(s) du produit chimique testé, application, durée d'exposition et de post-exposition;

— description des critères d'évaluation et de décision utilisés;

— description des critères d'acceptation de l'étude;

— description de toute modification apportée à la procédure;

— Description des critères de décision utilisés.

Résultats

— présentation sous forme de tableau des résultats de chaque échantillon d'essai (par ex., valeurs de l'opacité et de la DO_{490} et IVIS calculé pour le produit chimique testé et les témoins positifs, négatifs et étalons [si inclus], y compris les données des essais répétés, le cas échéant, et la moyenne ± écart type pour chaque essai);

— description des autres effets observés;

— la classification *in vitro* selon le SGH de l'O.N.U le cas échéant.

Discussion des résultats

Conclusion

▼**M7**

BIBLIOGRAPHIE

(1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report — *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponible à http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm

(2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No.10-7553. Research Triangle Park, NC:National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

(3) OCDE (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Série sur les essais et l'évalutation n° 189, OCDE, Paris.

(4) Nations Unies (2011). Système Général Harmonisé de l'Organisation des Nations Unies pour la Classification et l'ëtiquetage (SGH), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York et Genève: Nations Unies. Disponible à: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.

(5) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., and Zuang, V. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. in Vitro* 24:1-9.

(6) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report — In vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponible à: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

(7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Disponible à: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

(8) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay — SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italie: Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (ECVAM).

(9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. et Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

(10) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in Vitro* 20:78-81.

(11) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., et Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponible à http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf

▼**M7**

(12) Maurer, J.K., Parker, R.D. et Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(13) OCDE (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Série sur les essais et l'évaluation N° 160. Adopté en octobre 2011. Paris: Organisation de coopération et de développement économiques.

(14) Doughty, M.J., Petrou, S. et Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.

(15) Collee, J. et Bradley, R. (1997). BSE: A decade on — Part I. *The Lancet* 349: 636-641.

(16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., et Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam Appl Toxicol* 26:20-31.

(17) Chapitre B.5 de la présente annexe, Effet irritant/corrosif aigu sur les yeux.

(18) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponible à http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm

(19) OCDE (1998. Série sur les Principes de bonnes pratiques de laboratoire et vérification du respect de ces principes. Numéro 1: Les Principes de l'OCDE de Bonnes pratiques de laboratoire (tels que révisés en 1997).

Disponible à http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

▼M7

Appendice 1

DÉFINITIONS

Approche «bottom-up»: approche par étape utilisée pour un produit chimique pour lequel on anticipe qu'il ne relève d'aucune classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves. Cette approche commence par la détermination des produits chimiques ne relevant d'aucune classification (résultat négatif) par rapport aux autres produits chimiques (résultats positifs).

Approche «top-down»: approche par étape utilisée dans le cas d'un produit chimique pour lequel on estime qu'il provoque des lésions oculaires graves; cette approche commence par la détermination des produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves (résultat positif) par rapport aux autres produits chimiques (résultat négatif).

Catégorie 1 du SGH: Voir «Lésions oculairse graves»

Catégorie 2 du SGH: voir «Irritation oculaire»

Cornée: Partie transparente située à l'avant du globe oculaire, recouvrant l'iris et la pupille et laissant pénétrer la lumière vers l'intérieur de l'œil.

Danger: Propriété inhérente d'un agent ou situation susceptible de provoquer des effets indésirables lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-) population est exposé(e) à cet agent.

Effets irréversibles sur l'œil: voir «Lésions oculaires graves».

Effets réversibles sur l'œil: voir «Irritation oculaire».

Essai à plusieurs niveaux: Démarche expérimentale séquentielle consistant à examiner toutes les informations existantes sur un produit chimique testé dans un ordre déterminé, en ayant recours à chaque étape à un processus d'analyse du poids de la preuve pour déterminer si les informations disponibles sont suffisantes pour décider d'une classification des dangers, avant de passer à l'étape suivante. Si le potentiel d'irritation d'un produit chimique testé peut être déterminé sur la base des informations existantes, aucun essai supplémentaire n'est nécessaire. Si le potentiel d'irritation d'un produit chimique testé ne peut pas être déterminé sur la base des informations existantes, une procédure expérimentale progressive de type séquentiel sur des animaux est alors lancée jusqu'à ce qu'une classification sans équivoque puisse être effectuée.

Fiabilité: Indique dans quelle mesure la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite dans un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires au cours du temps, en utilisant le même mode opératoire. Pour l'évaluer, on calcule la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires et la répétabilité intra-laboratoire.

Irritation oculaire: Production de changements dans l'œil suite à l'application d'un produit chimique sur la surface antérieure de l'œil et qui sont totalement réversibles dans les 21 jours suivant l'application (2). L'expression est équivalente à «Effets réversibles sur l'œil» et avec «Catégorie 2 du SGH» (4).

Lésions oculaires graves: Lésions des tissus oculaires ou dégradation sévère de la vue, provoquées par l'application d'un produit chimique testé sur la surface antérieure de l'œil et qui ne sont pas totalement réversibles dans les 21 jours suivant l'application. L'expression est équivalente à «Effets irreversibles sur l'œil» et avec «Catégorie 1 du SGH» (4).

Mélange: un mélange ou une solution composée d'au moins deux substances qui ne réagissent pas entre elles (4).

▼M7

Mélange contenant des tensioactifs: Dans le contexte de la présente méthode d'essai, il s'agit d'un mélange contentant un ou plusieurs tensioactifs(s) à une concentration finale supérieure à 5 %.

Méthode d'essai validée: Méthode d'essai ayant fait l'objet d'études de validation visant à déterminer sa pertinence (notamment sa précision) et sa fiabilité à des fins spécifiques. Il importe de noter que les performances d'une méthode d'essai validée peuvent être insuffisantes en termes de précision et de fiabilité pour qu'elle soit jugée acceptable pour les besoins envisagés.

Non classé: produit chimique ne relevant d'aucune classification pour l'irritation oculaire (catégorie 2, 2A ou 2B du SGH de l'ONU) ou pour les lésions occulaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU). L'expression est équivalente à «Sans catégorie SGH».

Opacité cornéenne: Mesure de l'étendue du caractère opaque de la cornée suite à son exposition à un produit chimique testé. Une augmentation de l'opacité cornéenne indique un endommagement de la cornée. L'opacité peut être évaluée de manière subjective, par exemple lors du test de Draize réalisé sur les yeux de lapin, ou de manière objective à l'aide d'un instrument de mesure tel qu'un «opacitomètre».

Opacitomètre: Instrument servant à mesurer l'«opacité cornéenne» en évaluant la quantité de lumière transmise à travers la cornée. En général, cet instrument est composé de deux compartiments, chacun disposant de sa propre source lumineuse et d'une cellule photoélectrique. L'un des compartiments est utilisé pour la cornée traitée tandis que l'autre sert à étalonner l'instrument et à le mettre à zéro. La lumière provenant d'une lampe halogène est dirigée à travers un compartiment témoin (chambre vide, sans vitre ni liquide) vers une cellule photoélectrique, et comparée à la lumière envoyée à travers le compartiment expérimental, qui abrite la chambre contenant la cornée, jusqu'à une cellule photoélectrique. La lumière transmise par les deux cellules photoélectriques est ensuite comparée, et une valeur chiffrée d'opacité s'affiche sur un écran numérique.

Perméabilité cornéenne: Mesure quantitative de l'endommagement de l'épithélium cornéen via la détermination de la quantité de fluorescéine sodique traversant toutes les couches cellulaires de la cornée.

Poids de la preuve: Prise en compte des atouts et des faiblesses de divers éléments d'information en vue d'aboutir à une conclusion concernant le danger potentiel d'un produit chimique testé et d'étayer cette conclusion.

Précision: Degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa «pertinence». Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place du terme «concordance» pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique étalon: Produit chimique utilisé en tant que référence, en comparaison avec un produit chimique d'essai. Un produit chimique étalon doit présenter les propriétés suivantes: (i) provenir d'une ou de plusieurs sources constantes et fiables; (ii) présenter une similitude structurale et fonctionnelle avec la classe des produits chimiques soumis à l'essai; (iii) posséder des caractéristiques physiques/chimiques connues; (iv) être accompagnée de données confirmant ses effets connus; et (v) avoir une activité connue dans la fourchette des réponses désirées.

▼M7

Produit chimique testé: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Sans catégorie SGH: produit chimique qui ne relève d'aucune classification dans la catégorie 1 ou 2 (2A ou 2B) du SGH. Expression équivalente à «Non classé»

Score d'irritation in vitro (IVIS): Formule dérivée empiriquement et utilisée dans les essais OPCB, dans laquelle les valeurs d'opacité moyenne et de perméabilité moyenne pour chaque groupe de traitement sont combinées pour obtenir le score in vitro unique de chaque groupe de traitement. IVIS = valeur d'opacité moyenne + (15 x valeur moyenne de perméabilité).

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations unies): Système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans l'objectif de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (4).

Substance: Élément chimique et ses composés, présents à l'état naturel ou obtenus grâce à un procédé de production. Ce terme inclut tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit ainsi que toute impureté produite par le procédé utilisé, mais exclut tout solvant pouvant être extrait sans affecter la stabilité ni modifier la composition de la substance (4).

Tensioactif: Aussi appelé agent de surface; substance telle qu'un détergent, qui peut réduire la tension superficielle d'un liquide et donc lui permettre de mousser ou pénétrer des solides; aussi appelant agent mouillant.

Taux de faux négatifs: Proportion de produits chimiques positifs faussement identifiés comme négatifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Taux de faux positifs: Proportion de produits chimiques négatifs faussement identifiés comme positifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Témoin de solvant/véhicule: Échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, y compris le solvant ou véhicule utilisé pour tester les échantillons témoins traités ou non avec la substance d'essai afin de déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec la substance d'essai dissoute dans le même solvant ou véhicule. Testé avec un témoin négatif concurrent, cet échantillon indique également si le solvant ou véhicule interagit avec le système d'essai.

Témoin négatif: Réplique non traitée contenant tous les composants d'un système d'essai. Cet échantillon subit les mêmes procédures que les échantillons traités avec la substance d'essai et les autres échantillons témoins afin de déterminer si le solvant interagit avec le système d'essai.

Témoin positif: Réplique contenant tous les composants d'un système d'essai, et traité avec une substance induisant notoirement une réponse positive. Afin de pouvoir évaluer la variabilité des réponses du témoin positif dans le temps, la sévérité de la réponse ne devra pas être **excessive.**

▼M7

Appendice 2

VALEUR PRÉDICTIVE DE LA MÉTHODE D'ESSAI OPCB

Tableau 1

Valeur prédictive de la méthode OPCB pour identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves [Cat. 1 ou Pas cat. 1 (Cat. 2 + «sans catégorie») du SGH de l'ONU / CLP de l'UE; Cat. I ou Pas cat. I (Cat. II + Cat. III + Cat. IV) de l'EPA des États-Unis]

Système de classification	Nb	Précision		Sensibilité		Faux négatifs		Spécificité		Faux positifs	
		%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb
SGH de l'ONU CLP de l'UE	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25.40	32/126
US EPA	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Tableau 2

Valeur prédictive de la méthode OPCB pour identifier les produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave («non-irritants») [«sans catégorie» ou Pas «sans catégorie» (Cat. 1 + Cat. 2) du SGH de l'ONU / CLP de l'UE; Cat. IV ou Pas cat. IV (Cat. I + Cat. II + Cat. III) de l'EPA des États-Unis]

Système de classification	Nb	Précision		Sensibilité		Faux négatifs		Spécificité		Faux positifs	
		%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.
SGH de l'ONU CLP de l'UE	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
EPA des États-Unis	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

▼M7

Appendice 3

PRODUITS CHIMIQUES A UTILISER POUR L'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE RELATIVE A LA MÉTHODE D'ESSAI OPCB

Avant d'utiliser en routine la présente méthode d'essai, les laboratoires doivent démontrer leurs compétences techniques en établissant correctement la classification des dangers pour l'œil présentés par les 13 produits chimiques préconisés dans le tableau 1. Ces produits chimiques ont été sélectionnés de façon à représenter la gamme des réactions selon le danger qu'ils représentent pour l'œil, sur la base des résultats de l'essai in vivo sur œil de lapin (LD 405) (17) et du SGH des Nations Unies (c'est-à-dire les catégories 1, 2A, 2B ou Non classé) (4). Les autres critères de sélection sont la disponibilité des produits chimiques dans le commerce, l'existence de données de référence in vivo de bonne qualité, et l'existence de données in vitro de bonne qualité obtenues grâce à la méthode OPCB. Les données de référence figurent dans le Récapitulatif simplifié (3) et dans les Background Review Documents de l'ICCVAM pour la méthode d'essai d'opacité et de perméabilité de la cornée bovine (2)(18).

Tableau 1

Produits chimiques recommandés pour démontrer les compétences techniques relatives à la méthode d'essai OPCB

Produit chimique	N°CAS	Classe chimique (1)	Forme physique	Classification *in vivo* (2)	Classification OPCB
Chlorure de benzalkonium (5 %)	8001-54-5	Composé d'onium	Liquide	Catégorie 1	Catégorie 1
Chlorhexidine	55-56-1	Amine, Amidine	Solide	Catégorie 1	Catégorie 1
Acide dibenzoyl-L-tartrique	2743-38-6	Acide carboxylique, Ester	Solide	Catégorie 1	Catégorie 1
Imidazole	288-32-4	Hétérocyclique	Solide	Catégorie 1	Catégorie 1
Acide trichloracétique (30 %)	76-03-9	Acide carboxylique	Liquide	Catégorie 1	Catégorie 1
Chlorure de 2,6-dichlorobenzoyle	4659-45-4	Halogénure d'acyle	Liquide	Catégorie 2A	Aucune prédiction précise/fiable n'est possible
Éthyle-2-acétoacétate de méthyle	609-14-3	Cétone, Ester	Liquide	Catégorie 2B	Aucune prédiction précise/fiable n'est possible
Nitrate d'ammonium	6484-52-2	Sel inorganique	Solide	Catégorie 2 (3)	Aucune prédiction précise/fiable n'est possible
EDTA, sel dipotassique	25102-12-9	Amine, Acide carboxylique (sel)	Solide	Non classé	Non classé
Tween 20	9005-64-5	Ester, Polyéther	Liquide	Non classé	Non classé
2-Mercaptopyrimidine	1450-85-7	Halogénure d'acyle	Solide	Non classé	Non classé
Phénylbutazone	50-33-9	Hétérocyclique	Solide	Non classé	Non classé

▼**M7**

Produit chimique	N°CAS	Classe chimique (1)	Forme physique	Classification *in vivo* (2)	Classification OPCB
Lauryl éther de poly-oxyéthylène 23 (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Alcool	Liquide	Non classé	Non classé

Abréviations: N°CAS = numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service

(1) Des catégories chimiques ont été assignées à chaque produit chimique selon un schéma de classification standard, basé sur le système de classification des National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (disponible à l'adresse: http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) D'après les résultats issus de l'essai sur œil de lapin *in vivo* (LD OCDE 405) (17) et en utilisant le SGH de l'ONU (4).

(3) La classification dans les catégories 2A ou 2B dépend de l'interprétation des critères du SGH de l'ONU pour distinguer ces deux catégories, à savoir que l'on doit constater des effets chez 1 sur 3 ou 2 sur 3 animaux le septième jour pour classer le produit dans la catégorie 2A. L'étude *in vivo* est menée sur 3 animaux. Tous les effets sauf une rougeur conjonctivale chez un animal avaient disparu le septième jour ou avant. Le seul animal chez lequel la rougeur n'avait pas disparu le septième jour (score de 1) était pleinement rétabli le dixième jour.

▼M7

Appendice 4

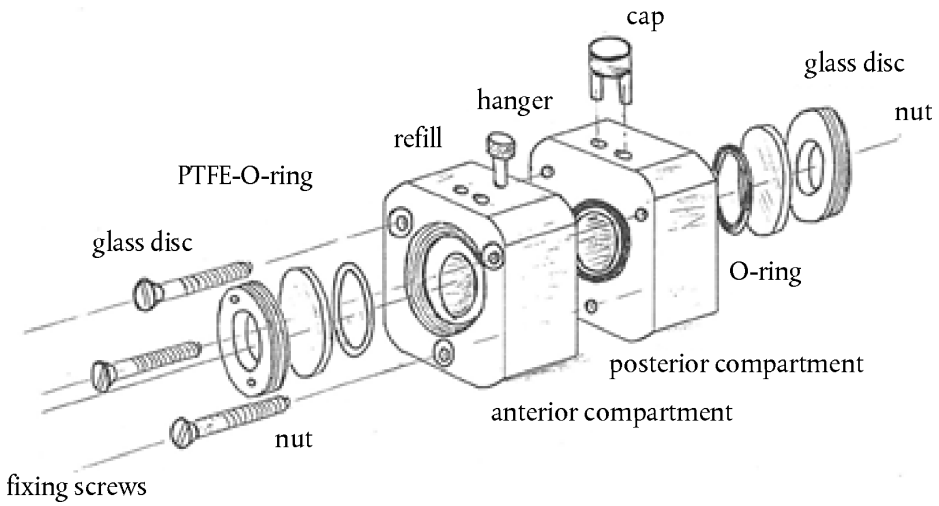
LE PORTE-CORNÉE POUR LA MÉTHODE OPCB

Les porte-cornées pour OPCB sont fabriqués à partir d'un matériau inerte (polypropylène par exemple). Ils se composent de deux parties (une chambre antérieure et une chambre postérieure) et possèdent deux chambres internes cylindriques identiques. Chaque chambre, d'une contenance de 5 ml, est fermée par une vitre à travers laquelle les mesures d'opacité sont enregistrées. Chacune des chambres internes mesure 1,7 cm de diamètre et 2,2 cm de profondeur ([1]). Un joint torique situé au niveau de la chambre postérieure empêche toute fuite. La cornée est placée face endothéliale dessous, sur le joint torique de la chambre postérieure, et la chambre antérieure est placée du côté épithélial de la cornée. Les chambres sont maintenues en place par trois vis en acier inoxydable situées sur les bordures extérieures du porte-cornée. Chaque chambre comporte à son extrémité une vitre amovible permettant d'accéder facilement à la cornée. Un joint torique placé entre la vitre et la chambre empêche toute fuite. L'introduction et le vidage du milieu et des produits chimiques d'essai se font par deux trous situés sur la face supérieure de chaque chambre. Pendant le traitement et les périodes d'incubation, ils sont fermés par des capuchons en caoutchouc. La transmission de la lumière à travers les porte-cornées peut varier dans la mesure où les effets de l'usure ou l'accumulation de certains résidus chimiques sur les trous des chambres internes ou sur les vitres peut modifier la répartition ou la réflectance de la lumière. En conséquence, on peut observer une augmentation ou une diminution de la lumière de référence transmise (et une variation inversement proportionnelle des mesures d'opacité de référence) à travers les porte-cornées, ces changements pouvant être marqués dès les premières mesures d'opacité de la cornée dans les chambres individuelles (autrement dit, les valeurs initiales d'opacité de la cornée dans des porte-cornées individuels spécifiques peuvent facilement varier de plus de 2 ou 3 unités d'opacité par rapport aux valeurs de référence attendues). Chaque laboratoire doit envisager d'élaborer un programme pour évaluer les variations de transmission de la lumière à travers les porte-cornées, selon la nature des produits chimiques testés et la fréquence d'utilisation des chambres. Pour établir des valeurs de référence, on peut contrôler les porte-cornées avant l'utilisation en routine en mesurant les valeurs d'opacité (ou de transmission de la lumière) de référence des chambres remplies de tout le milieu, sans cornées. Les porte-cornées peuvent ensuite être contrôlés périodiquement pour vérifier si la transmission de la lumière varie durant les périodes d'utilisation. Chaque laboratoire peut établir la fréquence de contrôle des porte-cornées, selon les produits chimiques testés, la fréquence d'utilisation et les variations observées par rapport aux valeurs d'opacité cornéenne de référence. Si l'on observe des variations notables de la lumière transmise à travers les porte-cornées, il convient d'appliquer les procédures appropriées de nettoyage et/ou de polissage de la surface interne des porte-cornées voire de la remplacer.

([1]) Les dimensions indiquées ici sont celles d'un porte-cornée utilisé pour des bovins âgés de 12 à 60 mois. Pour des animaux entre 6 et 12 mois, le porte-cornée est conçu de manière à posséder des chambres d'une contenance de 4 ml chacune et dont les dimensions intérieures sont de 1,5 cm de diamètre et 2,2 cm de profondeur. Pour tout porte-cornée nouvellement conçu, il est essentiel que le rapport entre la surface cornéenne exposée et le volume de la chambre postérieure soit le même que celui du porte-cornée classique. Cette condition est indispensable pour garantir que les valeurs de perméabilité sont correctement déterminées pour le calcul du SIIV par la formule donnée

▼M7

Porte-cornée: vue éclatée



▼**M7**

Appendice 5

L'OPACITOMÈTRE

L'opacitomètre est un appareil permettant de mesurer la transmission de la lumière. Par exemple, dans le cas de l'équipement OP-KIT d'Electro Design (Riom, France) utilisé pour valider la méthode OPCB, la lumière d'une lampe halogène est dirigée à travers un compartiment témoin (chambre vide, sans vitre ni liquide) vers une cellule photoélectrique, et comparée à la lumière envoyée à travers le compartiment expérimental, qui abrite la chambre contenant la cornée, jusqu'à une cellule photoélectrique. La lumière transmise par les deux cellules photoélectriques est ensuite comparée, et une valeur chiffrée d'opacité s'affiche sur un écran numérique. Les unités d'opacité sont alors définies. D'autres types d'opacitomètres présentant une configuration différente (par exemple, ne nécessitant pas de mesurer en parallèle le compartiment témoin et le compartiment expérimental) peuvent être utilisés s'il est prouvé qu'ils donnent des résultats similaires à ceux de l'équipement validé.

L'opacitomètre fournit une réponse linéaire par le biais d'un éventail de mesures d'opacité couvrant les seuils utilisés pour les différentes classifications décrites par le modèle de prévision (c'est-à-dire, jusqu'aux seuils déterminant le caractère corrosif/fortement irritant). Afin de garantir des mesures linéaires et précises jusqu'à 75-80 unités d'opacité, il est nécessaire d'étalonner l'opacitomètre à l'aide d'une série de calibreurs. Les calibreurs sont placés à l'intérieur de la chambre d'étalonnage (une chambre de porte-cornée destinée à contenir les calibreurs) et une mesure des calibreurs est réalisée sur l'opacitomètre. La chambre d'étalonnage est conçue pour maintenir les calibreurs approximativement à la même distance de la source lumineuse et de la cellule photoélectrique que celle où se trouveront les cornées lors des mesures d'opacité. Les valeurs de référence et le point déterminé initialement dépendent du type d'équipement utilisé. Il convient de s'assurer de la linéarité des mesures d'opacité en appliquant les procédures appropriées (en fonction de l'instrument). Par exemple, pour l'équipement OP-KIT d'Electro Design (Riom, France), l'opacitomètre est tout d'abord étalonné à 0 unité d'opacité en utilisant la chambre d'étalonnage sans calibreur. Trois calibreurs différents sont ensuite placés l'un après l'autre à l'intérieur de la chambre d'étalonnage, et l'opacité est mesurée. Les calibreurs 1, 2 et 3 présentent des mesures d'opacité égales à leur valeur de consigne, soit respectivement 75, 150 et 225 unités d'opacité, ± 5 %.

▼M7

B.48. MÉTHODE D'ESSAI SUR ŒIL DE POULET ISOLÉ POUR L'IDENTIFICATION DES PRODUITS CHIMIQUES I) PROVOQUANT DES LÉSIONS OCULAIRES GRAVES ET II) NE RELEVANT D'AUCUNE CLASSIFICATION POUR IRRITATION OCULAIRE OU LÉSION OCULAIRE GRAVE

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 438 (2013) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La méthode d'essai sur œil de poulet isolé (OPI) a été évaluée par le Comité de coordination inter-agences pour la validation des méthodes alternatives (ICCVAM) des États-Unis, en collaboration avec le Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (ECVAM) et le Centre japonais pour la validation de méthodes alternatives (JaCVAM), en 2006 et 2010 (1)(2)(3). La première évaluation a permis de valider scientifiquement l'utilité de la méthode OPI pour le dépistage des produits chimiques (substances et mélanges) provoquant des lésions oculaires graves (catégorie 1) selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU) (1)(2)(4) et du règlement (CE) n° 1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (CLP) ([1]). La seconde évaluation a consisté à déterminer l'utilité de la méthode OPI pour le dépistage des produits chimiques non classés comme irritants pour l'œil ou provoquant de graves lésions oculaires selon la définition du SGH de l'ONU (3) (4). Les résultats de l'étude de validation et les recommandations du panel d'examen ont confirmé la recommandation initiale selon laquelle il convient d'utiliser la méthode OPI pour la classification des produits chimiques pouvant provoquer de lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU), car la base de données disponible était restée inchangée depuis la première validation de l'ICCVAM. À ce stade, il n'a pas été recommandé d'étendre le champ d'application de la méthode OPI pour inclure d'autres catégories. Le jeu de données in vitro et in vivo utilisé lors de l'étude de validation a été réévalué dans le but de déterminer l'utilité de la méthode OPI pour identifier les produits chimiques ne nécessitant aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave (5). D'après les conclusions de cette réévaluation, la méthode OPI peut aussi être utilisée pour identifier les produits chimiques qui ne relèvent d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave selon la définition du SGH de l'ONU (4) (5). La présente méthode d'essai indique les applications recommandées et les limites de la méthode OPI au regard de ces évaluations. Les principales différences entre la version originale de 2009 et la mise à jour de 2013 de la ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques concernent notamment: l'application de la méthode OPI pour identifier les produits chimiques ne relevant d'aucune classification au titre du SGH de l'ONU, une mise à jour concernant les éléments du rapport d'essai, une mise à jour de l'appendice 1 sur les définitions, et une mise à jour de l'appendice 2 sur les substances d'épreuve.

Il est généralement admis que dans notre horizon de prévision, aucun essai unique d'irritation oculaire in vitro ne pourra remplacer le test oculaire in vivo de Draize pour établir le degré d'irritation provoqué par les différentes classes de produits chimiques. Cependant, la combinaison de plusieurs méthodes de substitution dans le cadre d'une stratégie d'essais (à plusieurs niveaux) pourrait remplacer le test oculaire de Draize (6). L'approche «top-down» (5) est indiquée lorsque, d'après les informations existantes, on s'attend à ce qu'un produit chimique soit fortement irritant, alors que l'approche «bottom-up» (7) est conçue pour être appliquée quand, au vu des informations existantes, un produit chimique devrait a priori ne causer aucune irritation oculaire suffisante nécessitant une classification. La méthode OPI est une méthode d'essai in vitro pouvant être utilisée, dans certaines circonstances et compte tenu de ses limites particulières décrites aux paragraphes 8 à 10, pour classer et étiqueter les produits chimiques en fonction de leur caractère dangereux pour l'œil. Alors qu'elle n'est pas jugée valable pour remplacer purement et simplement la méthode d'essai in

([1]) Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006, JO L 353 du 31.12.2008, p.1.

▼M7

vivo sur les yeux de lapin, la méthode OPI est recommandée comme première étape d'une stratégie d'essai telle que l'approche «top-down» suggérée par Scott et al. (7) pour identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves, à savoir les produits relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU, sans expérience supplémentaire (4). La méthode OPI est aussi recommandée pour identifier les produits chimiques ne nécessitant aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, ainsi que le définit le SGH de l'ONU («sans catégorie») (4), et peut donc être utilisée comme première étape dans le cadre d'une stratégie d'essai telle que l'approche «bottom-up» (7). Cependant, un produit chimique qui, avec la méthode OPI, semble ne causer aucune lésion oculaire grave ou ne relever d'aucune classification pour irritation oculaire/lésion oculaire grave nécessiterait d'être soumis à des essais complémentaires (in vitro et/ou in vivo) pour établir une classification définitive. En outre, les autorités réglementaires compétentes devraient être consultées avant de mettre en œuvre l'essai OPI dans une approche «bottom-up» dans le cadre d'autres systèmes de classification que le SGH de l'ONU.

L'objectif de la présente méthode d'essai est de décrire les procédures utilisées pour évaluer le danger potentiel d'un produit chimique pour l'œil, mesuré par la propension du produit chimique à induire ou non une toxicité dans un œil de poulet énucléé. Les effets toxiques pour la cornée sont mesurés par (i) une estimation qualitative de l'opacité, (ii) une estimation qualitative des dommages subis par l'épithélium, fondée sur l'application de fluorescéine sur l'œil (rétention de fluorescéine), (iii) une mesure quantitative de l'augmentation de l'épaisseur (gonflement), et (iv) une évaluation qualitative des dommages morphologiques macroscopiques infligés en surface. L'opacité cornéenne, le gonflement et l'estimation des dommages après exposition à un produit chimique d'essai sont évalués individuellement, puis combinés pour établir une classification d'effet irritant pour les yeux.

Les définitions des termes utilisés sont données à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

La présente méthode d'essai est fondée sur le protocole suggéré dans le document d'orientation 160 de l'OCDE (8), élaboré à la suite de l'étude de validation internationale de l'ICCVAM (1)(3)(9), enrichie de contributions apportées par le Centre européen pour la validation des méthodes d'essais alternatives (ECVAM), le Centre japonais de validation des méthodes d'essais alternatives (JaCVAM), et le Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology du TNO (Pays-Bas). Le mode opératoire s'appuie sur des informations dérivées de protocoles publiés, et de celui actuellement employé par le TNO (10) (11) (12) (13) (14).

Les essais réalisés dans le cadre de l'étude de validation sous-tendant cette méthode d'essai ont porté sur un large éventail de produits chimiques; la base de données empiriques de cette étude totalisait 152 produits chimiques dont 72 substances et 80 mélanges (5). La présente méthode d'essai peut être utilisée pour tester des solides, des liquides, des émulsions et des gels. Les liquides peuvent être aqueux ou non; les solides peuvent être solubles ou insolubles dans l'eau. Les gaz et les aérosols n'ont pas encore fait l'objet d'une étude de validation.

La méthode OPI peut être utilisée pour identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves, à savoir les produits chimiques relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU (4). Appliquée dans ce but, cette méthode présente pour limites un taux élevé de faux positifs pour les alcools et un taux élevé de faux négatifs pour les matières solides et les tensioactifs (1)(3)(9). Toutefois, le taux de faux négatifs (produits relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU mais identifiés comme n'en relevant pas) n'est pas préoccupant dans ce contexte car tous les produits chimiques d'essai qui donnent des résultats négatifs feraient ensuite l'objet d'un ou plusieurs autres essais in vitro dûment validés, ou en dernier recours d'essais chez le lapin, en fonction des exigences de la réglementation, selon une démarche expérimentale séquentielle fondée sur l'analyse du

▼M7

poids de la preuve. Il convient de relever que les solides peuvent entraîner des conditions d'exposition variables et extrêmes lors du test d'irritation de l'œil in vivo de Draize, ce qui peut fausser la prédiction de leur véritable potentiel d'irritation (15). Les investigateurs peuvent envisager d'utiliser cette méthode d'essai pour tous les types de produits chimiques, à condition d'admettre qu'un résultat positif indique un effet provoquant des lésions oculaires graves, autrement dit de classer le produit chimique d'essai dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU sans mener d'essai complémentaire. Toutefois, il convient d'interpréter avec précaution les résultats positifs obtenus avec des alcools, compte tenu du risque de surestimation des résultats positifs.

Utilisée pour identifier les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU), la méthode OPI présente une précision d'ensemble de 86 % (120/140), un taux de faux positifs de 6 % (7/113) et un taux de faux négatifs de 48 % (13/27), en comparaison avec les données de la méthode d'essai in vivo sur les yeux de lapin classées selon le système de classification du SGH de l'ONU (4)(5).

La méthode OPI peut aussi être utilisée pour identifier les produits chimiques qui ne nécessitent aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave suivant le système de classification du SGH de l'ONU (4). Les autorités réglementaires compétentes devraient être consultées avant de mettre en œuvre l'essai OPI dans une approche «bottom-up» dans le cadre d'autres systèmes de classification que le SGH de l'ONU. Cette méthode d'essai peut être utilisée pour tous les types de produits chimiques, un résultat négatif pouvant être accepté pour ne pas de classer un produit chimique pour irritation oculaire et lésion oculaire grave. Cependant, au regard d'un résultat de la base de données de validation, il est possible que les peintures antisalissures contenant des solvants organiques soient sous-évaluées (5).

Utilisée pour identifier les produits chimiques qui ne nécessitent pas de classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, la méthode OPI présente une précision d'ensemble de 82 % (125/152), un taux de faux positifs de 33 % (26/79) et un taux de faux négatifs de 1 % (1/73), en comparaison avec les données de la méthode d'essai in vivo sur œil de lapin classées selon le système de classification du SGH de l'ONU (4)(5). Lorsque les produits chimiques d'essai de certaines catégories chimiques (à savoir, les peintures antisalissures contenant des solvants organiques) sont exclus de la base de données, la précision de l'OPI est de 83 % (123/149), le taux de faux positifs de 33 % (26/78), et le taux de faux négatifs de 0 % (0/71) au regard du système de classification du SGH de l'ONU (4)(5).

La méthode OPI n'est pas recommandée pour identifier les produits chimiques d'essai qui devraient être classés comme irritants pour l'œil (catégorie 2 ou catégorie 2A du SGH de l'ONU) ou les produits chimiques d'essai qui devraient être classés comme légèrement irritants pour l'œil (catégorie 2B du SGH de l'ONU) en raison du nombre considérable de produits chimiques de la catégorie 1 du SGH de l'ONU sous-classés dans les catégories 2, 2A ou 2B, du SGH de l'ONU et de produits chimiques ne relevant d'aucune catégorie du SGH de l'ONU surclassés dans les catégories 2, 2A ou 2B du SGH de l'ONU. Aussi pourrait-il être nécessaire de mener des essais complémentaires avec une autre méthode adaptée.

Tous les modes opératoires sur l'œil de poulet doivent respecter les réglementations applicables aux installations d'essai et les protocoles de manipulation de matériaux issus de l'homme et de l'animal, comprenant notamment, sans s'y limiter, les tissus et les fluides tissulaires. L'usage des précautions universelles de laboratoire est recommandé (16).

Si la méthode OPI ne prend pas en considération les lésions conjonctivales et de l'iris évaluées par la méthode d'essai d'irritation oculaire chez le lapin, elle porte sur les effets observés sur la cornée qui sont les principaux critères de classification in vivo au regard du SGH de l'ONU. En outre, et bien qu'il soit impossible d'étudier la réversibilité des lésions cornéennes per se par la méthode d'essai OPI, on a proposé d'utiliser une estimation de la profondeur initiale d'une telle lésion afin de distinguer certains types d'effets irréversibles, en s'appuyant sur les études sur l'œil de lapin (17). En particulier, il apparaît nécessaire d'approfondir les connaissances scientifiques disponibles pour comprendre comment apparaissent

▼M7

les effets irréversibles non liés à une grave lésion initiale. Enfin, la méthode d'essai OPI ne permet pas l'évaluation du potentiel de toxicité systémique associé à une exposition oculaire.

La présente méthode d'essai sera périodiquement actualisée après examen de nouvelles informations et de nouvelles données. Par exemple, l'histopathologie peut s'avérer utile lorsqu'une caractérisation plus détaillée des lésions cornéennes est nécessaire. Pour évaluer cet éventuel développement, les utilisateurs sont invités à conserver les yeux et à préparer des échantillons pour l'histopathologie en vue d'établir une base de données et des critères de décision susceptibles d'améliorer la précision de cette méthode d'essai. L'OCDE a élaboré un document d'orientation sur l'utilisation des méthodes d'essai de toxicité oculaire in vitro, qui intègre des procédures détaillées sur la collecte des échantillons d'histopathologie et indique où soumettre les échantillons et/ou les résultats histopathologiques (8).

Tout laboratoire conduisant cet essai pour la première fois utilise les produits chimiques d'épreuve de compétence mentionnés à l'appendice 2. Il peut utiliser ces produits chimiques pour démontrer sa compétence technique en matière d'application de la méthode d'essai OPI préalablement à la soumission des données obtenues avec cet essai à des fins de classification réglementaire des dangers.

PRINCIPE DE L'ESSAI

La méthode d'essai OPI est un modèle organotypique qui permet le maintien à court terme d'yeux de poulet in vitro. Selon cette méthode, les dommages provoqués par le produit chimique d'essai sont évalués par détermination du gonflement, de l'opacité et de la rétention de fluorescéine de la cornée. L'observation des deux derniers paramètres est qualitative, alors que l'analyse du gonflement de la cornée est quantitative. Chaque mesure est reportée sous forme d'un score quantitatif utilisé pour calculer un indice d'irritation général, ou affectée à une catégorie qualitative utilisée pour appliquer une classification des produits chimiques dangereux pour l'œil in vitro, à savoir soit la catégorie 1 du SGH de l'ONU soit la catégorie Non classé du SGH de l'ONU. L'un ou l'autre de ces résultats peut ensuite être utilisé pour prédire si un produit chimique d'essai peut causer des lésions oculaires graves in vivo ou si elle ne nécessite aucune classification relative aux dangers des produits chimiques pour l'œil (se référer aux critères de décision). Cependant, on ne peut classer aucun produit chimique qui, avec la méthode OPI, ne semble causer aucune lésion oculaire grave ou ne relever d'aucune classification (voir le paragraphe 11).

Source et âge des yeux de poulet

Habituellement, on utilise dans cet essai des yeux prélevés sur des poulets provenant de l'abattoir où ils sont tués pour la consommation humaine, et les animaux de laboratoire sont donc inutiles. On utilise uniquement des yeux d'animaux sains dont l'entrée dans la chaîne alimentaire humaine est autorisée.

Aucune étude contrôlée visant à évaluer l'âge optimal des poulets n'a encore été menée, mais l'âge et le poids des poulets habituellement utilisés dans cette méthode d'essai sont ceux des petits poulets couramment traités dans un abattoir de volailles (à savoir, environ 7 semaines et 1,5 — 2,5 kg).

Collecte et transport des yeux au laboratoire

Les têtes sont coupées immédiatement après sédation des poulets, généralement par choc électrique, et incision des cous pour la saignée. Il conviendra d'identifier une source locale de poulets proche du laboratoire, afin que le transfert des têtes entre l'abattoir et le laboratoire soit suffisamment rapide pour limiter autant que possible la détérioration et/ou la contamination bactérienne. Il faut réduire au minimum l'intervalle qui sépare la collecte des têtes de poulets et le placement des yeux dans la chambre de surfusion suivant l'énucléation (généralement deux heures) pour assurer le respect des critères d'acceptation de l'essai. Tous les yeux utilisés dans l'essai proviennent d'un groupe d'yeux collectés le même jour.

▼M7

Les yeux étant disséqués au laboratoire, les têtes sont transportées intactes depuis l'abattoir, à température ambiante (généralement entre 18 °C et 25 °C), dans des boîtes en plastique humidifiées par des tissus mouillés d'une solution saline isotonique.

Critères de sélection et nombre d'yeux utilisés dans la méthode OPI

Les yeux dont la coloration initiale par la fluorescéine ou le score d'opacité de la cornée sont élevés après énucléation (> 0,5 dans les deux cas) sont rejetés.

Chaque groupe de traitement et chaque groupe témoin positif parallèle comprend au moins trois yeux. Le groupe témoin négatif ou le témoin de solvant (si on utilise un solvant qui n'est pas une solution saline) comprend au moins un œil.

Dans le cas des matières solides se révélant non classées selon le SGH de l'ONU, il est recommandé de procéder à un second essai sur trois yeux afin de confirmer ou d'infirmer le premier résultat négatif obtenu.

MODE OPÉRATOIRE

Préparation des yeux

Les paupières sont soigneusement excisées en veillant à ne pas endommager la cornée. L'intégrité de celle-ci est évaluée au moyen d'une goutte de fluorescéine sodique à 2 % (p/p) appliquée sur la surface cornéenne pendant quelques secondes, puis rincée par une solution saline isotonique. Les yeux traités à la fluorescéine sont examinés au biomicroscope pour vérifier si la cornée est ou non endommagée (ce qui se traduit par une rétention de fluorescéine et une opacité cornéenne $\leq$ 0,5).

L'œil non endommagé est ensuite énucléé, en veillant à ne pas endommager la cornée. On tire le globe oculaire hors de l'orbite en maintenant fermement la membrane nictitante à l'aide de pinces chirurgicales, et les muscles de l'œil sont coupés avec des ciseaux courbes à pointes émoussées. Il est important d'éviter de léser la cornée par une pression excessive (artéfacts de compression).

Lorsque l'œil est retiré de l'orbite, une portion visible du nerf optique reste attachée. Une fois retiré de l'orbite, l'œil est placé sur un tampon absorbant et la membrane nictitante et le reste des tissus conjonctifs sont découpés.

L'œil énucléé est monté dans un clamp en acier inoxydable, en plaçant la cornée verticalement. Le clamp est ensuite transféré dans une chambre de l'appareil de surfusion (18). Dans l'appareil de surfusion, les clamps sont placés de telle sorte que la totalité de la cornée soit alimentée par le goutte-à-goutte de solution saline isotonique (3-4 gouttes par minute ou 0,1 à 0,15 ml/min). La température dans les chambres de l'appareil de surfusion est régulée à 32 ± 1,5 °C. L'appendice 3 propose un schéma d'un appareil de surfusion normal et des clamps pour œil, disponibles dans le commerce ou à construire. L'appareil peut être modifié en fonction des besoins d'un laboratoire particulier (par exemple, pour contenir un nombre d'yeux différent).

Une fois placés dans l'appareil de surfusion, les yeux sont à nouveau examinés au biomicroscope afin de s'assurer qu'ils n'ont pas été endommagés pendant le protocole de dissection. L'épaisseur de la cornée est mesurée à ce moment au sommet de la cornée au moyen du dispositif de mesure dont est muni le biomicroscope. Il faut remplacer les yeux (i) dont la rétention de fluorescéine est > 0,5, (ii) dont l'opacité cornéenne est > 0,5; ou (iii) qui présentent tout autre signe de lésion. Les yeux qui satisfont tous ces critères, mais dont l'épaisseur cornéenne s'écarte de plus de 10 % de la valeur moyenne calculée pour l'ensemble des yeux sont également rejetés. La mesure de l'épaisseur cornéenne peut varier en fonction du réglage de la largeur de la fente du biomicroscope, et les examinateurs tiennent compte de cette contrainte en ajustant cette largeur à 0,095 mm.

▼M7

Une fois tous les yeux examinés et admis dans l'étude, ils sont incubés pendant environ 45 à 60 minutes pour s'équilibrer dans le système d'essai avant l'administration du produit chimique d'essai. Cette période est suivie des mesures au temps de référence zéro de l'épaisseur et de l'opacité cornéenne, qui serviront de mesures initiales (temps 0). Le score de fluorescéine à la dissection est la mesure initiale pour cet effet.

Application du produit chimique d'essai

Immédiatement après les mesures de référence au temps 0, l'œil (dans son support) est retiré de l'appareil de surfusion, placé en position horizontale et le produit chimique d'essai est appliquée sur la cornée.

Les produits chimiques liquides sont généralement testés sans dilution, mais ils peuvent être dilués si besoin est (par exemple, dans une étape du modèle de l'étude). Il est préférable d'utiliser une solution physiologique pour diluer les produits chimiques d'essai. Il est toutefois possible d'utiliser d'autres solvants en conditions contrôlées, sous réserve de démontrer le bien-fondé de leur utilisation au lieu de la solution physiologique saline.

Les produits chimiques liquides sont appliqués sur la cornée de façon à couvrir uniformément la totalité de la surface; le volume habituel est de 0,03 ml.

Dans la mesure du possible, les produits chimiques solides sont broyés pour obtenir la plus grande finesse au moyen d'un mortier et d'un pilon, ou d'un outil de broyage comparable. La poudre est appliquée sur la cornée de façon à couvrir uniformément la totalité de la surface; la quantité habituelle est de 0,03 mg.

Le produit chimique d'essai (liquide ou solide) est appliqué pendant 10 secondes, puis éliminée par rinçage de l'œil avec une solution saline isotonique (environ 20 ml) à température ambiante. L'œil (dans son support) est ensuite remis dans l'appareil de surfusion dans la position verticale originelle. En cas de besoin, il est possible d'effectuer un rinçage supplémentaire après l'application de 10 secondes ainsi qu'aux points de mesure ultérieurs (par exemple, si l'on découvre des résidus du produit chimique d'essai sur la cornée). En général, la quantité de solution saline utilisée en plus pour le rinçage n'est pas importante, contrairement en revanche à l'adhérence observée du produit chimique d'essai sur la cornée.

Produits chimiques témoins

Il convient d'inclure des témoins négatifs ou de solvant/véhicule et des témoins positifs concomitants dans chaque expérience.

Dans le cas d'essais de liquides purs ou de solides, on utilise une solution saline physiologique comme témoin négatif parallèle dans la méthode d'essai OPI pour détecter des changements non spécifiques dans le système d'essai, et pour vérifier que les conditions de l'essai ne provoquent pas de réponse irritante indésirable.

Lors des essais de liquides dilués, il convient d'inclure un groupe témoin de solvant/véhicule concomitants dans la méthode d'essai pour détecter des changements non spécifiques dans le système d'essai, et pour vérifier que les conditions de l'essai ne provoquent pas de réponse irritante indésirable. Comme le mentionne le paragraphe 31, il ne faut utiliser que des solvants ou des véhicules dont l'absence d'effet néfaste sur le système d'essai a été démontrée.

Chaque expérience comprend un produit chimique irritant connu en tant que témoin positif parallèle, afin de vérifier l'induction d'une réponse appropriée. Dans cette méthode d'essai, l'essai OPI a pour vocation d'identifier des produits chimiques ayant des effets irritants graves ou corrosifs; le témoin positif est donc un produit chimique de référence qui induit une réponse forte dans la méthode d'essai. Toutefois, afin d'assurer que la variabilité de la réponse du témoin positif au cours du temps peut être évaluée, l'ampleur de la réponse forte ne doit pas être

▼M7

excessive. Les données in vitro obtenues pour le témoin positif doivent être suffisantes pour permettre le calcul d'une gamme de réponse acceptable défini statistiquement. S'il n'existe pas de données antérieures adéquates issues de la méthode d'essai OPI pour un témoin positif donné, il peut être nécessaire de mener des études susceptibles de fournir ces informations.

L'acide acétique 10 % ou le chlorure de benzalconium 5 % sont des exemples de témoins positifs pour des produits chimiques d'essai liquides, tandis que l'hydroxyde de sodium ou l'imidazole peuvent jouer ce rôle pour les produits chimiques d'essai solides.

Les produits chimiques étalons sont utiles pour évaluer le potentiel d'irritation oculaire de produits chimiques inconnus d'une catégorie chimique ou d'une catégorie de produits spécifique, ou pour évaluer le potentiel d'irritation relatif d'une substance irritante pour les yeux dans un intervalle spécifique de réponses irritantes.

Effets mesurés

Les cornées traitées sont évaluées avant le traitement et 30, 75, 120, 180, et 240 minutes (± 5 minutes) après le rinçage suivant le traitement. Ces points de mesure sont en nombre suffisant sur la période de traitement de 4 heures et les intervalles entre les mesures permettent d'effectuer les observations requises sur tous les yeux.

Les effets mesurés sont l'opacité cornéenne, le gonflement, la rétention de fluorescéine et les effets morphologiques (par exemple, piqûres ou relâchement de l'épithélium). Tous les effets mesurés, à l'exception de la rétention de fluorescéine (qui est déterminée uniquement avant le traitement et 30 minutes après l'exposition au produit chimique d'essai) sont déterminés à chaque point temporel indiqué ci-dessus.

Il est conseillé de prendre des photographies pour illustrer l'opacité cornéenne, la rétention de fluorescéine, les effets morphologiques et, le cas échéant, les observations histopathologiques.

Après l'examen final à quatre heures, il est recommandé de conserver les yeux dans un fixateur approprié (par exemple, formol tamponné à pH neutre) en vue d'un éventuel examen histopathologique (voir le paragraphe 14 et la référence (8) pour des explications détaillées).

Le gonflement cornéen est déterminé par des mesures d'épaisseur de la cornée réalisées au moyen d'un pachymètre optique monté sur un biomicroscope. Il est exprimé en pourcentage et calculé à partir de mesures de l'épaisseur de la cornée selon la formule suivante:

$$\left(\frac{\textit{épaisseur de la cornée au temps } t - \textit{épaisseur de la cornée au temps} = 0}{\textit{épaisseur de la cornée au temps} = 0} \right) \times 100$$

Le pourcentage moyen de gonflement de la cornée pour tous les yeux est calculé à chaque point temporel observé. Un score de catégorie général est attribué à chaque produit chimique d'essai, dérivé du score moyen de gonflement de la cornée le plus élevé observé sur tous les points temporels (paragraphe 51).

Le score d'opacité cornéenne est calculé sur la surface de cornée qui est la plus fortement opacifiée comme le montre le tableau 1. La valeur moyenne d'opacité cornéenne pour tous les yeux est calculée pour chaque point temporel observé. Un score de catégorie général est attribué à chaque produit chimique d'essai, dérivé du score moyen d'opacité cornéenne le plus élevé observé sur tous les points temporels (paragraphe 51).

▼M7

Tableau 1

Scores d'opacité cornéenne

Score	Observation
0	Aucune opacité
0,5	Très faible opacité
1	Zones d'opacité dispersées ou diffuses; détails de l'iris nettement visibles
2	Zone translucide aisément discernable; détails de l'iris légèrement masqués
3	Forte opacité cornéenne; aucun détail spécifique de l'iris n'est visible; la taille de la pupille est à peine discernable
4	Complète opacité cornéenne; l'iris est invisible

La rétention de fluorescéine est évaluée uniquement au point temporel d'observation de 30 minutes comme le montre le tableau 2. La valeur moyenne de rétention de fluorescéine est ensuite calculée pour tous les yeux observés au point d'observation de 30 minutes et utilisée pour déterminer le score de catégorie général de chaque produit chimique d'essai (paragraphe 51).

Tableau 2

Scores de rétention de fluorescéine

Score	Observation
0	Pas de rétention de fluorescéine
0,5	Coloration très mineure de cellules individuelles
1	Coloration de cellules individuelles éparses dans toute la zone traitée de la cornée
2	Coloration dense de foyers de cellules individuelles ou de cellules à confluence
3	Grandes zones confluentes de cornée retenant la fluorescéine

Les effets morphologiques comprennent la «piqûre» des cellules épithéliales cornéennes, le «relâchement» de l'épithélium, la «rugosité» de la surface cornéenne et l'«adhésion» du produit chimique d'essai sur la cornée. La gravité de ces effets est variable et ils peuvent être observés simultanément. Leur classification est subjective et dépend de l'interprétation de l'observateur.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation des données

Les résultats d'opacité cornéenne, de gonflement et de rétention de fluorescéine sont évalués séparément et aboutissent à la détermination d'une catégorie OPI par effet mesuré. Ces catégories sont ensuite combinées en une classification d'effet irritant pour chaque produit chimique d'essai.

Critères de décision

Après évaluation de tous les effets, on peut assigner le produit chimique à une catégorie selon un barème prédéterminé. L'interprétation du gonflement de la cornée (tableau 3), de l'opacité (tableau 4) et de la rétention de fluorescéine (tableau 5) au moyen de 4 catégories d'OPI, suit les échelles indiquées ci-après. Il est important de relever que les scores de gonflement cornéen

▼M7

donnés au tableau 3 ne sont applicables que si l'épaisseur est mesurée au moyen d'un biomicroscope (Haag-Streit BP900, par exemple) par un dispositif de mesure de profondeur n° 1 avec un réglage de largeur de fente à $9\frac{1}{2}$, soit 0,095 mm. Les utilisateurs tiennent compte du fait que les mesures d'épaisseur de cornée par un biomicroscope varient en fonction du réglage de la largeur de fente.

Tableau 3

Critères de classification OPI pour le gonflement de la cornée

Gonflement moyen de la cornée (%) (*)	Catégorie OPI
0 à 5	I
> 5 à 12	II
> 12 à 18 (> 75 min après traitement)	II
> 12 à 18 (≤ 75 min après traitement)	III
> 18 to 26	III
> 26 à 32 (> 75 min après traitement)	III
> 26 à 32 (≤ 75 min après traitement)	IV
> 32	IV

(*) Score moyen le plus élevé observé sur tous les points temporels

Tableau 4

Critères de classification OPI pour l'opacité

Score moyen maximal d'opacité (*)	Catégorie OPI
0,0-0.5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Score moyen maximal observé sur tous les points temporels (à partir des scores d'opacité tels que définis au tableau 1).

Tableau 5

Critères de classification OPI pour la rétention moyenne de fluorescéine

Score de rétention moyenne de fluorescéine 30 minutes après traitement (*)	Catégorie OPI
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) À partir des scores d'opacité tels que définis au tableau 2.

La classification in vitro d'un produit chimique d'essai est déterminée par la catégorie d'effet irritant qui correspond à la combinaison des catégories obtenues pour le gonflement cornéen, l'opacité cornéenne et la rétention de fluorescéine, ainsi que décrit au tableau 6.

▼M7

Tableau 6

Classification générale des effets in vitro

Classification du SGH de l'ONU	Combinaison des 3 variables
Sans catégorie	3 × I 2 × I, 1 × II
Aucune prédiction n'est possible	Autre combinaison
Catégorie1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Opacité cornéenne ≥ 3 à 30 min (dans au moins deux yeux) Opacité cornéenne = 4 en un point temporel quelconque (dans au moins deux yeux) Relâchement important de l'épithélium (dans au moins un œil)

(*) Combinaisons moins probables.

Critères d'acceptation de l'étude

Un essai est considéré comme acceptable lorsque les témoins négatifs et de véhicule/solvant parallèles et les témoins positifs concurrents sont identifiés, respectivement, comme ne relevant pas de la classification du SGH et comme relevant de la catégorie 1 du SGH de l'ONU.

Rapport d'essai

Le rapport d'essai contient les renseignements suivants, dès lors qu'ils s'appliquent à l'étude:

Produit chimique d'essai et produits chimiques témoins

— nom(s) chimique(s), par exemple nom de la structure chimique utilisé par le Chemical Abstracts Service (CAS), suivi d'autres noms, s'ils sont connus;

— numéro d'enregistrement CAS (N°CAS), s'il est connu;

— pureté et composition du produit chimique d'essai/témoin [en pourcentage(s) par unité de poids], dans la mesure où cette information est disponible;

— propriétés physico-chimiques (telles que l'état physique, la volatilité, le pH, la stabilité, la classe chimique, l'hydrosolubilité) utiles pour la conduite de l'étude;

— le cas échéant, traitement des produits chimiques d'essai et témoins avant l'essai (par exemple, chauffage, réduction en poudre);

— stabilité (si connue);

Renseignements relatifs au donneur d'ordre et à l'installation d'essai

— nom et adresse du commanditaire, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude;

— identification de la source des yeux (par exemple, établissement auprès duquel ils ont été recueillis);

Conditions de la méthode d'essai

— description du système d'essai utilisé;

▼M7

— biomicroscope (lampe à fente) utilisé (par exemple, modèle) et réglage de l'appareillage du biomicroscope;

— référence aux résultats témoins positifs et négatifs antérieurs et, le cas échéant, aux données antérieures démontrant les gammes de témoins de référence parallèles acceptables;

— procédure utilisée pour garantir l'intégrité (c'est-à-dire la précision et la fiabilité) de la méthode d'essai sur la durée (par exemple, essais périodiques de substances d'épreuve des compétences);

Collecte et préparation des yeux

— âge et poids de l'animal donneur et, dans la mesure du possible, d'autres caractéristiques spécifiques des animaux sur lesquels ont été prélevés les yeux (par exemple, sexe, souche);

— stockage et conditions de transport des yeux (par exemple, date et heure du prélèvement, délai entre la collecte des têtes de poulet et le placement des yeux énucléés dans la chambre de surfusion);

— préparation et montage des yeux y compris les notifications relatives à leur qualité, la température des chambres où sont placés les yeux, et les critères de sélection des yeux utilisés pour l'essai;

Mode opératoire

— nombre de réplicats utilisés;

— identité des témoins négatifs et positifs utilisés (le cas échéant, aussi des témoins de référence et du solvant);

— dose, application et temps d'exposition du produit chimique d'essai utilisés;

— points temporels d'observation (avant et après traitement);

— description des critères d'évaluation et de décision utilisés;

— description des critères d'acceptation de l'étude utilisés;

— description de toutes les modifications du mode opératoire;

Résultats

— présentation sous forme de tableau des scores du gonflement cornéen, de l'opacité cornéenne et de la rétention de fluorescéine obtenus pour chaque œil et à chaque point temporel d'observation, y compris les scores moyens à chaque point d'observation pour tous les yeux testés;

— les scores moyens les plus élevés du gonflement cornéen, de l'opacité cornéenne et de la rétention de fluorescéine observés (tout point temporel confondu), et leur catégorie OPI correspondante;

— description de tous les autres effets observés;

— la classification du SGH in vitro retenue;

— le cas échéant, photographies de l'œil.

Discussion des résultats

Conclusion

▼**M7**

BIBLIOGRAPHIE

(1) ICCVAM (2007), Test Method Evaluation Report — In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponible à l'adresse: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm

(2) ESAC (2007), Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic in vitro assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Disponible à l'adresse: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(3) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Disponible à l'adresse: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm

(4) Nations unies (2011), Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH), Quatrième édition révisée, ONU, New York et Genève, 2011. Disponible à l'adresse: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_f.html

(5) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Série sur les essais et les évaluations n° 188 (Parties 1 et 2), OCDE, Paris.

(6) Chapitre B.5 de la présente annexe OCDE (2012), Effet irritant/corrosif aigu sur les yeux.

(7) Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010), A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace in vivo Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. Toxicology In Vitro 24, 1-9.

(8) OCDE (2011), Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants. Série de l'OCDE sur les essais et l'évaluation n° 160, OCDE, Paris.

(9) ICCVAM. (2006), Background review document: Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponible à l'adresse: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm

(10) Prinsen, M.K. et Koëter, B.W.M. (1993), Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. Fd. Chem. Toxicol. 31:69-76.

(11) DB-ALM (INVITTOX) (2009), Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13pp. Disponible à l'adresse: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/.

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. et Spielmann H. (1995), The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. Toxicol. In Vitro 9:871-929.

(13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol*. 34:291-296.

▼**M7**

(14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

(15) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? Toxicology *in Vitro* 20,78-81.

(16) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L. et Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007), Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponible à l'adresse: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf.

(17) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(18) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼M7

Appendice 1

DÉFINITIONS

Approche «bottom-up»: approche en plusieurs étapes appliquée à un produit chimique présumé ne pas nécessiter de classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, et dont la première étape consiste à distinguer les produits chimiques ne relevant d'aucune classification (résultat négatif) des autres produits chimiques (résultat positif).

Approche «top-down»: approche en plusieurs étapes appliquée à un produit chimique présumé provoquer des lésions oculaires graves, et dont la première étape consiste à distinguer les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves (résultat positif) des autres produits chimiques (résultat négatif).

Biomicroscope (lampe à fente): instrument utilisé pour examiner directement l'œil sous le grossissement d'un microscope binoculaire en créant une image stéréoscopique droite. Dans la méthode d'essai OPI, cet instrument est utilisé pour visualiser les structures antérieures de l'œil de poulet et également pour mesurer objectivement l'épaisseur de la cornée au moyen d'un dispositif adjoint de mesure de la profondeur.

Catégorie 1 du SGH: voir «Lésion oculaire grave» et/ou «Effets irréversibles sur l'œil».

Catégorie 2 du SGH: voir «Irritation oculaire» et/ou «Effets réversibles sur l'œil».

Cornée: partie transparente à l'avant du globe oculaire qui couvre l'iris et la pupille et laisse passer la lumière vers l'intérieur.

Danger: propriété inhérente d'un agent ou d'une situation susceptible de provoquer des effets néfastes lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-)population est exposé(e) à cet agent.

Effets irréversibles sur l'œil: voir «Lésion oculaire grave» et «Catégorie 1 du SGH».

Effets réversibles sur l'œil: voir «Irritation oculaire» et «Catégorie 2 du SGH».

Fiabilité: mesure dans laquelle la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires ainsi que la répétabilité intra-laboratoire.

Gonflement cornéen: mesure objective dans l'essai OPI de l'ampleur de la distension de la cornée après exposition à un produit chimique d'essai. Elle est exprimée en pourcentage et calculée au moyen des mesures initiales (avant administration de la dose) d'épaisseur cornéenne, et des mesures d'épaisseur relevées à intervalles réguliers après exposition au produit chimique d'essai dans l'essai OPI. Le degré de gonflement cornéen est un indicateur d'endommagement de la cornée.

Irritation oculaire: modification de l'œil provoquée par l'application d'un produit chimique d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui est totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application. Interchangeable avec «Effets réversibles sur l'œil» et avec «Catégorie 2 du SGH de l'ONU» (4).

Lésion oculaire grave: lésion des tissus oculaires ou dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'un produit chimique d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui n'est pas totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application. Interchangeable avec «Effets irréversibles sur l'œil» et avec «Catégorie 1 du SGH» (4).

▼M7

Mélange: mélange ou solution composée de deux substances ou plus, qui ne réagissent pas entre elles (4)

Méthode d'essai validée: méthode d'essai ayant fait l'objet d'études de validation visant à déterminer sa pertinence (notamment sa précision) et sa fiabilité à des fins spécifiques. Il importe de noter que les performances d'une méthode d'essai validée peuvent être insuffisantes en termes de précision et de fiabilité pour qu'elle soit jugée acceptable pour les besoins envisagés.

Non classé: produit chimique qui n'est pas classé comme irritant oculaire (catégorie 2 du SGH de l'ONU) ou comme pouvant provoquer des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU). Interchangeable avec «Sans catégorie dans le SGH de l'ONU».

Opacité cornéenne: mesure de l'étendue de l'opacité de la cornée après exposition à un produit chimique d'essai. L'augmentation de l'opacité cornéenne est un indicateur d'endommagement de la cornée.

Poids de la preuve: prise en compte des atouts et des faiblesses de divers éléments d'information en vue d'aboutir à une conclusion concernant le danger potentiel d'un produit chimique et d'étayer cette conclusion.

Précision: degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un de ses aspects de pertinence. Le terme est souvent utilisé indifféremment à la place du terme «concordance» pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai.

Produit chimique: une substance ou un mélange

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Produit chimique étalon: produit chimique utilisé comme référence dans une comparaison avec un produit chimique d'essai. Un produit chimique étalon présente les propriétés suivantes: (i) source(s) régulière(s) et fiable(s); (ii) similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie des produits chimiques à tester; (iii) caractéristiques physiques et chimiques connues; (iv) données confirmant les effets connus; et (v) puissance connue dans l'intervalle de la réponse désirée.

Rétention de fluorescéine: mesure subjective dans l'essai OPI de la quantité de fluorescéine sodique qui est retenue par les cellules épithéliales de la cornée après exposition à un produit chimique d'essai. Le degré de rétention de fluorescéine est un indicateur d'endommagement de la cornée.

Sans catégorie dans le SGH de l'ONU: substances qui ne répondent pas aux critères de classification des catégories 1 ou 2 (2A ou 2B) du SGH de l'ONU. Interchangeable avec «Non classé».

▼M7

SGH [Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (ONU)]: système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans le but de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (4).

Stratégie d'essais à plusieurs niveaux: démarche expérimentale séquentielle consistant à examiner toutes les informations existantes sur un produit chimique d'essai dans un ordre déterminé, en ayant recours à chaque étape à un processus d'analyse du poids de la preuve afin de déterminer si les informations disponibles sont suffisantes pour décider d'une classification dans une catégorie de danger, avant de passer à l'étape suivante. Si le potentiel d'irritation d'un produit chimique d'essai peut être déterminé sur la base des informations existantes, aucun essai supplémentaire n'est nécessaire. Dans le cas contraire, une procédure expérimentale progressive de type séquentiel sur des animaux est alors lancée jusqu'à ce qu'une classification sans équivoque puisse être effectuée.

Substance: un élément chimique et ses composés à l'état naturel ou obtenus par un processus de fabrication, y compris tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit et toute impureté résultant du processus mis en œuvre, mais à l'exclusion de tout solvant pouvant être séparé de la substance sans en affecter la stabilité ni modifier la composition (4).

Taux de faux négatifs: proportion de produits chimiques positifs faussement identifiés comme négatifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Taux de faux positifs: proportion des produits chimiques négatifs faussement identifiés comme positifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Témoin de solvant/véhicule: échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, y compris le solvant ou véhicule utilisé pour tester les échantillons témoins traités ou non avec le produit chimique d'essai afin de déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique d'essai dissoute dans le même solvant ou véhicule. Testé avec un témoin négatif concurrent, cet échantillon indique également si le solvant ou véhicule interagit avec le système d'essai.

Témoin négatif: réplicat non traité contenant tous les composants d'un système d'essai. Cet échantillon subit les mêmes procédures que les échantillons traités avec le produit chimique d'essai et les autres échantillons témoins afin de déterminer si le solvant interagit avec le système d'essai.

Témoin positif: réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai et traité avec un produit chimique induisant notoirement une réponse positive. Pour permettre d'évaluer la variabilité de la réponse du témoin positif dans le temps, la gravité de la réaction ne doit pas être excessive.

Tensioactif: aussi appelé agent tensioactif, il s'agit d'une substance, par exemple un détergent, capable de réduire la tension superficielle d'un liquide et de favoriser ainsi sa capacité à mousser ou à pénétrer les solides; il est aussi connu comme agent mouillant.

▼M7

Appendice 2

PRODUITS CHIMIQUES POUR L'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE RELATIVE A LA MÉTHODE D'ESSAI OPI

Avant d'utiliser en routine une méthode d'essai conforme à la présente méthode d'essai, les laboratoires démontrent leurs compétences techniques en déterminant correctement la catégorie de danger pour l'œil des 13 produits chimiques recommandés dans le tableau 1. Ces produits chimiques ont été sélectionnés de façon à représenter la gamme des réactions selon le danger qu'ils représentent pour l'œil, sur la base des résultats de l'essai in vivo sur œil de lapin (LD 405) et du SGH de l'ONU (c'est-à-dire les catégories 1, 2A, 2B ou «Sans catégorie») (4) (6). Les autres critères de sélection sont la disponibilité des substances dans le commerce, l'existence de données de référence in vivo de bonne qualité, et l'existence de données de bonne qualité issues de la méthode in vitro OPI constituent d'autres critères de sélection. Les données de référence sont disponibles dans le Récapitulatif simplifié (5) et dans les documents de l'ICCVAM (Background Review Documents) pour la méthode OPI (9).

Tableau 1

Produits chimiques recommandés pour démontrer les compétences techniques relatives à la méthode OPI

Produit chimique	N° CAS	Classe chimique (1)	Forme physique	Classification *in vivo* (2)	Classification *in vitro* (3)
Chlorure de benzalkonium (5 %)	8001-54-5	Composé d'onium	Liquide	Catégorie 1	Catégorie 1
Chlorhexidine	55-56-1	Amine, Amidine	Solide	Catégorie 1	Catégorie 1
Acide dibenzoyl-L-tartrique	2743-38-6	Acide carboxylique, Ester	Solide	Catégorie 1	Catégorie 1
Imidazole	288-32-4	Hétérocyclique	Solide	Catégorie 1	Catégorie 1
Acide trichloracétique (30 %)	76-03-9	Acide carboxylique	Liquide	Catégorie 1	Catégorie 1
Chlorure de 2,6-dichlorobenzoyle	4659-45-4	Halogénure d'acyle	Liquide	Catégorie 2A	Aucune prédiction n'est possible (4)
Nitrate d'ammonium	6484-52-2	Sel inorganique	Solide	Catégorie 2A (5)	Aucune prédiction n'est possible (4)
Éthyle-2-acétoacétate de méthyle	609-14-3	Cétone, Ester	Liquide	Catégorie 2B	Aucune prédiction n'est possible (4)
Diméthyl sulfoxide	67-68-5	Composé organo-sulfuré	Liquide	Sans catégorie	Sans catégorie
Glycérol	56-81-5	Alcool	Liquide	Sans catégorie	Sans catégorie (limite)
Méthylcyclopentane	96-37-7	Hydrocarbure (cyclique)	Liquide	Sans catégorie	Sans catégorie
n-Hexane	110-54-3	Hydrocarbure (acyclique)	Liquide	Sans catégorie	Sans catégorie

▼**M7**

Produit chimique	N° CAS	Classe chimique (1)	Forme physique	Classification *in vivo* (2)	Classification *in vitro* (3)
Triacétine	102-76-1	Lipide	Liquide	Non classé	Sans catégorie

Abréviations: N°CAS = numéro d'enregistrement au Chemical Abstract Service

(1) Les classes de produits chimiques ont été attribuées à chaque produit chimique d'essai à l'aide d'un système de classification normalisé, fondé sur le système de classification du Medical Subject Headings (MeSH) de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis (disponible à l'adresse: http//www.nlm.nih.gov/mesh)

(2) D'après les résultats de l'essai in vivo sur œil de lapin (Ligne directrice de l'OCDE n° 405) et en utilisant le SGH (ONU) (4)(6).

(3) D'après les résultats obtenus avec la méthode OPI comme décrit au tableau 6.

(4) Combinaison des scores OPI autres que ceux décrits au tableau 6 pour l'identification des produits ne relevant d'aucune catégorie du SGH ou relevant de la catégorie 1 du SGH (tableau 6).

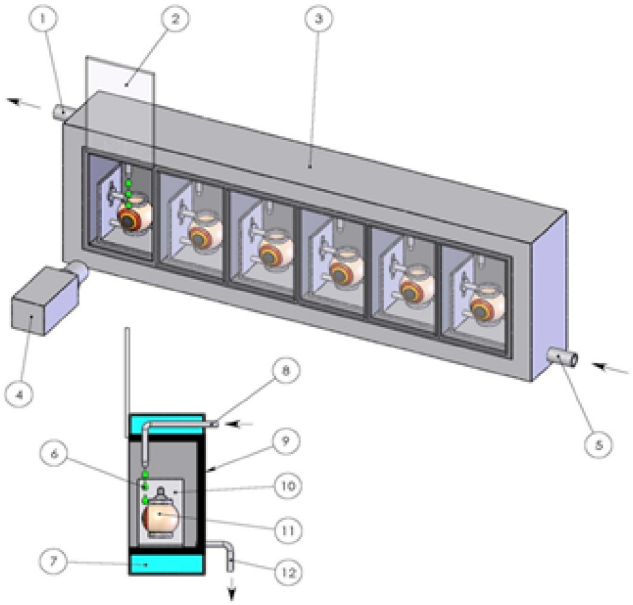
(5) La classification dans les catégories 2A ou 2B dépend de l'interprétation des critères du SGH de l'ONU pour distinguer ces deux catégories, à savoir que l'on doit constater des effets chez 1 sur 3 ou 2 sur 3 animaux le septième jour pour classer le produit dans la catégorie 2A. L'étude in vivo est menée sur 3 animaux. Tous les effets sauf une rougeur conjonctivale chez un animal avaient disparu le septième jour ou avant. Le seul animal chez lequel la rougeur n'avait pas disparu le septième jour (score de 1) était pleinement rétabli le dixième jour.

▼M7

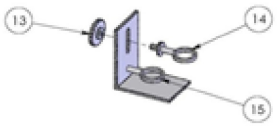
Appendice 3

SCHÉMA D'UN APPAREIL DE SURFUSION NORMAL ET DES CLAMPS POUR OEIL

(Voir Burton et al. (18) pour plus de détails génériques sur l'appareil de surfusion et les clamps pour oeil)



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

N° de la pièce	Description	N° de la pièce	Description
1	Sortie d'eau chaude	9	Compartiment
2	Porte coulissante	10	Support d'œil
3	Appareil de surfusion	11	Œil de poulet
4	Instrument de mesure optique	12	Sortie de solution saline
5	Entrée d'eau chaude	13	Vis de serrage
6	Solution saline	14	Branche supérieure réglable du clamp
7	Eau chaude	15	Branche inférieure fixe du clamp
8	Entrée de la solution saline		

▼M7

B.49. TEST DU MICRONOYAU *IN VITRO* SUR CELLULES DE MAMMIFÈRES

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 487 (2016) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Elle s'inscrit dans une série de méthodes d'essai de toxicologie génétique. Par ailleurs, un document de l'OCDE qui fournit des informations succintes sur les essais de génotoxicité et donne une vue d'ensemble des modifications récemment apportées à ces lignes directrices a été élaboré (1).

Le test du micronoyau in vitro (MNvit) est un essai de génotoxicité consistant à mettre en évidence d'éventuels micronoyaux (MN) dans le cytoplasme de cellules en interphase. Les micronoyaux peuvent avoir pour origine des fragments de chromosomes acentriques (c'est-à-dire dépourvus de centromère) ou des chromosomes entiers incapables de migrer vers les pôles de la cellule au cours de l'anaphase. Par conséquent, l'essai MNvit est une méthode in vitro qui, grâce à sa capacité de mise en évidence d'agents aneugènes et clastogènes, constitue un outil de base complet pour l'étude in vitro du potentiel de lésions chromosomiques (2) (3) dans des cellules ayant effectué une mitose pendant ou après l'exposition au produit chimique d'essai (voir paragraphe 13 pour des informations plus détaillées). Contrairement aux aberrations chromosomiques observées dans les cellules en métaphase, qui ne sont pas forcément transmises, les micronoyaux sont des lésions transmises aux cellules-filles. Dans les deux cas, les changements peuvent être incompatibles avec la survie des cellules.

La présente méthode d'essai autorise l'utilisation de protocoles incluant ou non la cytochalasine B (cytoB), un inhibiteur de polymérisation de l'actine. L'ajout de cytoB avant la mitose donne lieu à des cellules binucléées, ce qui permet l'identification et l'analyse des micronoyaux uniquement dans les cellules ayant effectué une mitose (4) (5). Cette méthode d'essai autorise également l'utilisation de protocoles ne mettant pas en jeu le blocage de la cytokinèse, à condition de pouvoir démontrer que la population cellulaire analysée a bien effectué une mitose.

Outre qu'il permet d'identifier des produits chimiques induisant la formation de micronoyaux, le test MNvit, associé au marquage immunochimique des kinétochores ou à l'hybridation avec sondes centromériques/télomériques [hybridation fluorescente in situ (FISH)], peut apporter des informations supplémentaires sur les mécanismes à l'origine des lésions chromosomiques et de la formation de micronoyaux (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Ces procédures de marquage et d'hybridation peuvent être suivies lorsqu'une augmentation de la formation de micronoyaux est constatée et que l'investigateur souhaite déterminer si cette augmentation est le résultat d'événements clastogènes et/ou aneugènes.

Dans la mesure où les micronoyaux présents dans les cellules en interphase peuvent être évalués de façon relativement objective, le personnel du laboratoire a seulement besoin de déterminer le nombre de cellules binucléées en cas d'utilisation de la cytoB ainsi que l'incidence des cellules micronucléées dans tous les cas. L'examen des lames peut donc être relativement rapide, et l'analyse peut être automatisée. Chaque traitement permettant l'examen non plus de centaines mais de milliers de cellules, la puissance de l'essai s'en trouve accrue. Enfin, étant donné que les micronoyaux peuvent être issus de chromosomes retardataires, l'essai peut permettre de détecter la présence d'agents inducteurs d'aneuploïdie, difficiles à étudier lors de tests d'aberration chromosomique classiques, tels que celui décrit dans le chapitre B.10 de la présente annexe (18). Toutefois, l'essai MNvit décrit dans la présente méthode d'essai ne permet pas de distinguer les produits chimiques modifiant le nombre de chromosomes et/ou la ploïdie de ceux induisant la clastogénicité sans avoir recours à des techniques spécifiques, telles que la méthode FISH citée au paragraphe 4.

L'essai MNvit est fiable et peut s'appliquer à plusieurs types de cellules, en présence ou en l'absence de cytoB. La validité de l'essai MNvit est attestée par de nombreuses données, et ce avec l'utilisation de différentes lignées cellulaires (cultures de lignées cellulaires ou de cellules primaires) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Ces données proviennent notamment des études internationales de validation coordonnées par la Société française de toxicologie génétique (SFTG) (19) (20) (21) (22) (23) et

▼M7

des rapports de l'International Workshop on Genotoxicity Testing (5) (17). Les données disponibles ont en outre fait l'objet d'une nouvelle évaluation lors d'une étude de validation rétrospective fondée sur le poids de la preuve, réalisée par le Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (ECVAM) de la Commission européenne (CE), et la méthode d'essai a été déclarée scientifiquement valable par le comité consultatif scientifique de l'ECVAM (ESAC) (37) (38) (39).

Le test de micronoyaux in vitro sur cellules de mammifères peut être pratiqué sur des cultures de lignées cellulaires ou des cultures de cellules primaires d'origine humaine ou de rongeurs. Dans la mesure où la fréquence des micronoyaux généralement constatée pour un type de cellule aura une influence sur la sensibilité de l'essai, il est recommandé d'utiliser des types de cellules pour lesquelles la fréquence habituelle de formation de micronoyaux est stable et définie. Les cellules employées sont choisies en fonction de leur capacité à bien se développer en culture, de la stabilité de leur caryotype (notamment leur nombre de chromosomes) et de la fréquence spontanée de micronoyaux (40). Les données disponibles à l'heure actuelle ne permettent pas d'émettre des recommandations fermes mais tendent à montrer qu'il importe de tenir compte, lors de l'évaluation des risques chimiques, du statut p53, de la stabilité génétique (caryotype), de la capacité de réparation de l'ADN et de l'origine (rongeurs ou humains) des cellules retenues pour l'essai. Les utilisateurs de la méthode d'essai sont donc invités à prendre en considération l'influence de ces caractéristiques cellulaires, et d'autres caractéristiques, sur les performances d'une lignée cellulaire quant à la détection de l'induction de micronoyaux, sachant que les connaissances évoluent dans ce domaine.

Les définitions utilisées sont données à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

À moins que les cellules utilisées ne soient dotées d'un métabolisme compatible avec les produits chimiques testés, les essais conduits in vitro requièrent généralement une source exogène d'activation métabolique. Or, les systèmes d'activation métabolique exogène sont incapables de reproduire parfaitement les conditions in vivo. On prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de conduire à de faux résultats positifs ne reflétant pas la génotoxicité des produits chimiques d'essai. Ces conditions peuvent être une modification du pH (41) (42) (43) ou de l'osmolalité, une interaction avec le milieu de culture cellulaire (44) (45) ou une cytotoxicité excessive (voir paragraphe 29).

Afin que l'analyse de l'induction de micronoyaux soit valable, il est essentiel que la mitose se soit produite aussi bien dans les cultures traitées et que dans les cultures non traitées. Pour que son intérêt soit maximal, l'examen des micronoyaux est effectué dans les cellules ayant achevé une mitose durant ou après l'application du produit chimique d'essai. Pour les nanomatériaux manufacturés, il est nécessaire d'apporter certaines adaptations spécifiques à la présente méthode d'essai, mais ces adaptations ne sont pas décrites dans le présent document.

Avant d'utiliser la méthode d'essai sur un mélange pour générer des données avec pour objectif recherché l'application réglementaire, on considérera si, et si oui pourquoi, elle peut fournir des résultats adéquats dans cet objectif. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé.

PRINCIPE DE L'ESSAI

Des cultures cellulaires d'origine humaine ou provenant d'autres mammifères sont exposées au produit chimique d'essai, en présence et en l'absence d'une source exogène d'activation métabolique, à moins que les cellules utilisées ne soient dotées de capacités métaboliques idoines (voir paragraphe 19).

Durant ou après l'exposition au produit chimique d'essai, les cellules sont mises en culture pendant une période suffisante pour que la lésion chromosomique ou d'autres effets sur le cycle cellulaire / la division cellulaire conduisent à la formation de micronoyaux dans les cellules en interphase. Le produit chimique d'essai est normalement présent au cours de la mitose pour qu'il y ait induction d'une aneuploïdie. Les cellules récoltées en interphase sont teintées et soumises à analyse en vue de la détection de micronoyaux. En principe, l'examen des micronoyaux ne devrait être réalisé que dans les cellules ayant effectué une mitose durant l'exposition au produit chimique d'essai, ou pendant la période

▼M7

qui suit le traitement, si l'essai la prévoit. Dans les cultures ayant été exposées à un agent de blocage de la cytokinèse, il suffit de procéder à l'examen des cellules binucléées. En l'absence d'agent de blocage de la cytokinèse, il importe de démontrer que les cellules analysées ont selon toute vraisemblance subi une mitose, d'après l'augmentation de la population cellulaire, pendant ou après l'exposition au produit chimique d'essai. Pour tous les protocoles, il convient de démontrer qu'une prolifération cellulaire a eu lieu tant dans les cultures témoins que dans les cultures traitées. Le degré de cytotoxicité ou de cytostase induit par le produit chimique d'essai est évalué pour toutes les cultures dans lesquelles est réalisé l'examen des micronoyaux.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Cellules

Il est possible d'utiliser des cultures primaires de lymphocytes du sang périphérique humain ou d'autres mammifères (7) (20) (46) (47) et plusieurs lignées cellulaires issues de rongeurs telles que CHO, V79, CHL/IU, ainsi que les cellules L5178Y ou des lignées cellulaires humaines telles que les TK6 (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (voir paragraphe 6). D'autres lignées cellulaires telles que HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), HepG2 (52) (53), A549 et les cellules embryonnaires primaires de hamster doré (54) ont été utilisées pour des tests du micronoyau, mais elles n'ont pas encore été validées complètement. Par conséquent, le recours à ces types de lignées cellulaires doit être justifié via la démonstration de leur performance pour l'essai, ainsi qu'il est indiqué dans la section sur les critères d'acceptabilité. La CytoB est réputée pouvoir influer sur la croissance des cellules L5178Y et n'est donc pas recommandée avec cette lignée cellulaire (23). En cas d'utilisation de cellules primaires, pour des raisons relatives au bien-être des animaux, il conviendra d'envisager, lorsque cela est possible, le recours à des cellules d'origine humaine, prélevées dans le respect des principes éthiques et de la réglementation en la matière.

Les lymphocytes du sang périphérique humain utilisés sont issus de sujets jeunes (âgés de 18 à 35 ans environ), non fumeurs, ne souffrant d'aucune maladie connue et n'ayant pas été exposés récemment à des niveaux d'agents génotoxiques (produits chimiques, rayonnements ionisants, par exemple) susceptibles d'augmenter l'incidence de fond des cellules micronucléées, ceci afin de garantir que cette incidence soit faible et homogène. L'incidence des cellules micronucléées augmente avec l'âge, et cette tendance est plus marquée chez la femme que chez l'homme (55). Si des cellules issues de plusieurs donneurs sont mises en commun, le nombre des donneurs est précisé. Il est nécessaire de démontrer que les cellules se sont divisées entre le moment où elles ont été traitées avec le produit chimique d'essai et leur prélèvement. Les cultures cellulaires sont maintenues dans une phase de croissance exponentielle (lignées cellulaires) ou encouragées à se diviser (cultures primaires de lymphocytes) en vue de l'exposition des cellules à différents stades du cycle cellulaire, étant donné que la sensibilité des phases cellulaires aux produits chimiques d'essai peut ne pas être connue. En général, les cellules primaires dont la division doit être stimulée par des agents mitogènes ne sont plus synchronisées lors de leur exposition au produit chimique d'essai (les lymphocytes humains après une stimulation mitogène de 48 heures, par exemple). L'utilisation de cellules synchronisées pendant le traitement avec le produit chimique d'essai n'est pas recommandée, mais peut être acceptable si elle est justifiée.

Milieu et conditions de culture

Il convient d'utiliser un milieu de croissance et des conditions d'incubation (récipients de culture, atmosphère humidifiée à 5 % de CO2 si nécessaire, température de 37°C) appropriées pour les cultures. La stabilité du caryotype (mode du nombre de chromosomes) et l'absence de contamination par des mycoplasmes sont vérifiées régulièrement dans les lignées cellulaires, et les cellules sont écartées si une contamination ou une modification du caryotype est constatée. La durée normale du cycle cellulaire des lignées ou des cultures primaires utilisées dans le laboratoire d'essai doit être établie et doit correspondre aux caractéristiques cellulaires publiées.

▼M7

Préparation des cultures

Lignées cellulaires: les cellules sont multipliées à partir de cultures mères, placées dans un milieu de culture à une densité telle que les cellules en suspension ou en monocouche poursuivront leur croissance de manière exponentielle jusqu'au moment de la récolte (il convient par exemple d'éviter que les cellules qui se multiplient en monocouche arrivent à confluence).

Lymphocytes: un sang total traité avec un anticoagulant (héparine, par exemple) ou des lymphocytes isolés sont mis en culture (pendant 48 heures pour les lymphocytes humains, par exemple) en présence d'un mitogène [phytohémagglutinine (PHA) pour les lymphocytes humains, par exemple] afin d'induire une division cellulaire avant l'exposition au produit chimique d'essai et à la cytoB.

Activation métabolique

Le recours à un système d'activation métabolique exogène est nécessaire en cas d'utilisation de cellules dotées d'une capacité métabolique endogène inadéquate. Le système le plus couramment utilisé, recommandé par défaut, à moins qu'un autre système soit justifié, est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteur (S9), préparée à partir de foies de rongeurs (généralement des rats) traités avec des inducteurs enzymatiques comme l'Aroclor 1254 (56) (57) ou un mélange de phénobarbital et de ß-naphthoflavone (58) (59) (60). L'utilisation de ce mélange n'est pas contraire à la Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants (61) et s'est révélée aussi efficace que celle de l'Aroclor 1254 pour l'induction d'oxydases à fonction mixte (58) (59) (60). La fraction S9 est généralement utilisée à une concentration comprise entre 1 et 2 % v/v mais peut être portée à 10 % v/v dans le milieu d'essai final. Pendant le traitement, on évitera d'utiliser des produits entraînant une réduction de l'indice mitotique, en particulier des complexants du calcium (62). Le choix du type et de la concentration du système d'activation métabolique exogène ou de l'inducteur métabolique utilisé pourra dépendre de la classe des produits chimiques à tester.

Préparation du produit chimique d'essai

Les produits chimiques solides à tester sont préparés dans un solvant approprié puis, le cas échéant, dilués avant application. Les produits chimiques liquides peuvent être ajoutés directement ou après dilution au système d'essai. Les produits chimiques gazeux ou volatils nécessitent une modification appropriée des protocoles standards, par exemple l'utilisation de récipients hermétiquement clos (63) (64) (65). Il convient de préparer les produits chimiques d'essai juste avant le traitement, à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'ils peuvent être stockés.

Conditions de l'essai

Solvants

Le solvant doit être choisi de manière à optimiser la solubilité des produits chimiques d'essai, sans engendrer d'effets néfastes sur la conduite de l'essai, et notamment sans modifier la croissance cellulaire, nuire à l'intégrité du produit chimique d'essai, réagir avec les récipients de culture ou détériorer le système d'activation métabolique. On recommande d'envisager d'abord l'utilisation d'un solvant (ou milieu de culture) aqueux chaque fois que c'est possible. L'eau et le diméthylsulfoxyde (DMSO) sont des solvants couramment utilisés. En règle générale, les solvants organiques ne doivent pas dépasser 1 % v/v. Si la cytoB est dissoute dans du DMSO, la quantité totale de solvant organique utilisée à la fois pour le produit chimique d'essai et pour la cytoB ne doit pas dépasser 1 % (v/v); sinon, on aura recours à des témoins non traités afin de vérifier que le pourcentage de solvant organique n'a pas d'effet néfaste. Les solvants aqueux (solution saline ou eau) ne doivent pas dépasser 10 % (v/v) dans le milieu de traitement final. L'emploi d'un solvant inhabituel (éthanol ou acétone, par exemple) doit être justifié par des données faisant état de sa compatibilité avec le produit chimique d'essai et le système d'essai, ainsi que de son absence de génotoxicité aux concentrations utilisées. En l'absence de telles données, il est

▼M7

important d'inclure dans l'essai des témoins non traités (voir appendice 1) ainsi que des témoins de solvant afin de démontrer que le solvant choisi n'entraîne pas d'effets délétères ou chromosomiques (aneuploïdie ou clastogénicité, par exemple).

Utilisation de la cytoB comme agent de blocage de la cytokinèse

Il est essentiel, pour garantir l'efficacité du test MNvit, que les cellules sur lesquelles est réalisé l'examen aient bien effectué une mitose durant le traitement ou pendant la période d'incubation qui suit le traitement, le cas échéant. L'examen des micronoyaux doit donc être limité aux cellules ayant effectué une mitose pendant ou après le traitement. La cytoB est l'agent le plus couramment utilisé pour bloquer la cytokinèse, car elle inhibe l'assemblage de l'actine, empêchant la séparation des cellules-filles après la mitose, d'où la formation de cellules binucléées (6) (66) (67). L'effet du produit chimique d'essai sur la cinétique de prolifération cellulaire peut être mesuré de façon concomitante, en cas de recours à la cytoB. L'usage de cytoB comme agent de blocage de la cytokinèse est indiqué lors de l'utilisation de lymphocytes humains, car la durée du cycle cellulaire est variable selon les donneurs et parce que tous les lymphocytes ne réagissent pas à la stimulation par la PHA. La cytoB n'est pas obligatoire pour les autres types de cellules s'il peut être établi que ces cellules ont subi une division tel que décrit au paragraphe 27. En outre, la cytoB n'est généralement pas utilisée lorsque la formation de micronoyaux dans les échantillons est évaluée par le biais de la cytométrie en flux.

Pour chaque type de cellule, le laboratoire détermine la concentration de cytoB permettant d'obtenir la fréquence optimale de cellules binucléées dans les cultures témoins de solvant, et démontre qu'elle produit suffisamment de cellules binucléées pour que l'on puisse procéder à une analyse. La concentration appropriée de cytoB se situe habituellement entre 3 et 6 μg/ml (19).

Mesure de la prolifération et de la cytotoxicité cellulaires et choix des concentrations d'essai

Lors de la détermination de la plus forte concentration du produit chimique d'essai, on évitera les concentrations susceptibles de produire de fausses réponses positives, notamment celles qui engendrent une cytotoxicité excessive (voir paragraphe 29), une précipitation dans le milieu de culture (voir paragraphe 30) ou une modification marquée du pH ou de l'osmolalité (voir paragraphe 9). Si le produit chimique d'essai provoque une modification marquée du pH du milieu au moment de son ajout, il est possible d'ajuster le pH par tamponnage du milieu de traitement final de manière à éviter les faux résultats positifs et à maintenir des conditions de culture appropriées.

Des mesures de la prolifération cellulaire sont effectuées pour s'assurer qu'un nombre suffisant de cellules traitées a effectué une mitose pendant l'essai et que les applications sont réalisées à des niveaux de cytotoxicité appropriés (voir paragraphe 29). La cytotoxicité doit être mesurée lors de l'expérience principale avec et sans activation métabolique, au moyen d'un indicateur pertinent de mort et de croissance cellulaires (voir paragraphes 26 et 27). Un essai préliminaire visant à évaluer la cytotoxicité peut s'avérer utile pour mieux cerner les concentrations à utiliser dans l'essai principal, mais il n'est pas obligatoire. S'il est réalisé, il ne doit pas remplacer la mesure de cytotoxicité effectuée dans le cadre de l'expérience principale.

L'application de cytoB sur les cultures et la mesure des fréquences relatives de cellules mononucléées, binucléées et multinucléées dans chaque culture offrent un moyen précis de quantifier l'effet d'un traitement sur la prolifération cellulaire et l'activité cytotoxique ou cytostatique (6) et de s'assurer que seules les cellules ayant effectué une mitose pendant ou après l'application sont observées au microscope. Il est conseillé de mesurer l'indice de prolifération des cellules dont la division cytoplasmique a été bloquée (cytokinesis-block proliferation index, CBPI) (6) (27) (68) ou l'indice de réplication (Replication Index, RI) à partir

▼M7

d'au moins 500 cellules par culture (voir les formules à l'appendice 2) pour estimer l'activité cytotoxique et cytostatique d'un traitement en comparant les valeurs obtenues pour les cultures traitées et les cultures témoins. L'évaluation d'autres indicateurs de cytotoxicité (intégrité cellulaire, apoptose, nécrose, numération des cellules en métaphase, cycle cellulaire, etc.) peut fournir des informations utiles mais ne doit pas remplacer le CBPI ou le RI.

Dans les études sans cytoB, il est nécessaire de démontrer que les cellules mises en culture se sont divisées, de sorte qu'une proportion importante des cellules examinées aient effectué une division cellulaire durant ou après l'exposition au produit chimique d'essai, faute de quoi on risque de produire de fausses réponses négatives. La mesure du doublement relatif de la population (Relative Population Doubling, RPD) ou de l'augmentation relative du nombre de cellules (Relative increase in cell count, RICC) est recommandée pour évaluer l'activité cytotoxique et cytostatique d'un traitement (17) (68) (69) (70) (71) (voir formules à l'appendice 2). Lorsque les prélèvements s'étalent sur une longue durée (par exemple, lorsque la durée du traitement équivaut à 1,5 à 2 fois la durée normale du cycle cellulaire et que la récolte a lieu à l'issue d'une durée équivalente après le traitement, ce qui engendre des moments d'échantillonnage allant au-delà de 3 à 4 fois la durée normale du cycle cellulaire au total (voir paragraphes 38 et 39), il se peut que le RPD sous-estime la cytotoxicité (71). Dans ces circonstances, la RICC pourrait constituer une meilleure mesure, mais l'évaluation de la cytotoxicité après une durée équivalente à 1,5 à 2 fois la durée normale du cycle cellulaire fournit néanmoins une estimation précieuse. L'évaluation d'autres marqueurs de cytotoxicité ou de cytostase (intégrité cellulaire, apoptose, nécrose, numération des cellules en métaphase, indice de prolifération, cycle cellulaire, ponts nucléoplasmiques ou bourgeons nucléaires, etc.) peut fournir d'autres informations utiles mais ne doit pas remplacer le RPD ni la RICC.

Il convient d'évaluer au moins trois concentrations d'essai (sans compter les témoins positifs et les témoins de solvant) remplissant les critères d'acceptabilité (cytotoxicité appropriée, nombre de cellules, etc.). Quel que soit le type de cellules (lignées cellulaires ou cultures primaires de lymphocytes), chacune des cultures réalisées en un seul ou plusieurs exemplaires peut être utilisée pour chaque concentration d'essai. Alors que l'utilisation de cultures en double exemplaires est recommandée, l'utilisation de cultures en exemplaire unique est aussi acceptée à condition que le nombre total de cellules analysées par concentration reste identique qu'il s'agisse de cultures uniques ou de répliques. L'utilisation de cultures uniques est pertinent en particulier lorsque quand on évalue plus de 3 concentrations (voir paragraphes 44-45). Les résultats obtenus pour chacune des répliques (cultures réalisées en plusieurs exemplaires) à une concentration donnée peuvent être regroupés pour l'analyse des données. Pour les produits chimiques dont la cytotoxicité est faible ou nulle, des niveaux de concentration séparés par un facteur de 2 à 3 environ conviendront généralement. En cas de cytotoxicité, les concentrations d'essai retenues doivent couvrir une plage englobant la concentration produisant une cytotoxicité telle que décrite au paragraphe 29 et les concentrations pour lesquelles une cytotoxicité modérée, faible ou nulle est observée. De nombreux produits chimiques d'essai présentent des courbes de concentration-réponse à forte pente et, pour obtenir des données dans le cadre d'une cytotoxicité faible et modérée ou étudier la relation dose-réponse en détail, il faudra donc utiliser des concentrations plus rapprochées et/ou plus de trois concentrations (cultures uniques ou répliques), notamment dans les cas où il est nécessaire de répéter l'expérience (voir paragraphe 60).

Si la concentration maximale est basée sur la cytotoxicité, la concentration la plus forte doit viser une cytotoxicité de 55 ± 5 % selon les paramètres de cytotoxicité recommandés (à savoir une réduction de la RICC et du RPD pour les lignées cellulaires sans cytoB et une réduction du CBPI et de l'indice de réplication quand la cytoB est utilisée à 45 ± 5 % du témoin négatif concomitant) (72). Les résultats positifs présents uniquement dans la tranche la plus haute de la plage de cytotoxicité 55 ± 5 % doivent être interprétés avec prudence (71).

▼**M7**

Pour les produits chimiques d'essai peu solubles qui ne sont pas cytotoxiques à des concentrations inférieures à la concentration insoluble la plus faible, la plus forte concentration analysée doit produire une turbidité ou un précipité visible à l'œil nu ou à l'aide d'un microscope inversé à la fin du traitement avec le produit chimique d'essai. Même si une cytotoxicité intervient au-delà de la concentration insoluble la plus faible, il est recommandé de tester une seule concentration produisant une turbidité ou un précipité visible, car de fausses réponses pourraient découler de ce précipité. A la concentration produisant un précipité, il convient de s'assurer que ce dernier n'interfère pas avec la conduite de l'essai (coloration ou analyse, par exemple). Il peut être utile de déterminer la solubilité dans le milieu de culture préalablement à l'essai.

Si aucun précipité ou aucune cytotoxicité limitante ne sont observés, la concentration d'essai maximale doit correspondre à la plus basse parmi 10 mM, 2 mg/ml ou 2 µl/ml (73) (74) (75). Lorsque la composition du produit chimique d'essai n'est pas définie, par exemple dans le cas d'une substance de composition inconnue ou variable, de produits de réaction complexes ou de matériels biologiques (UVCB) (76), de produits extraits de l'environnement, etc., il peut être nécessaire d'augmenter la concentration maximale (5 mg/ml par exemple), en l'absence de cytotoxicité suffisante, afin d'accroître la concentration de chacun des composants. Il convient toutefois de noter que ces exigences peuvent être différentes pour les produits pharmaceutiques à usage humain (93).

Témoins

Des témoins négatifs concomitants (voir paragraphe 21), constitués uniquement du solvant dans le milieu de traitement et testés de la même façon que les cultures traitées, doivent être inclus à tous les moments de récolte.

Des témoins positifs concomitants sont nécessaires pour démontrer la capacité du laboratoire à identifier les clastogènes et les aneugènes dans les conditions du protocole d'essai utilisé, ainsi que l'efficacité du système d'activation métabolique exogène, le cas échéant. Des exemples de témoins positifs figurent dans le tableau 1 ci-dessous. D'autres produits chimiques peuvent être utilisés comme témoins positifs, si cela est justifié.

À l'heure actuelle, aucun aneugène connu ne nécessite une activation métabolique pour présenter une activité génotoxique (17). Étant donné que les essais in vitro de génotoxicité sur cellules de mammifères sont suffisamment normalisés en ce qui concerne les traitements parallèles de courte durée effectués avec et sans activation métabolique pendant la même durée de traitement, l'utilisation de témoins positifs peut être limitée à un clastogène nécessitant une activation métabolique. Dans ce cas, une seule réponse clastogène dans un témoin positif démontrera à la fois l'activité du système d'activation métabolique et la réactivité du système d'essai. Toutefois, un traitement de longue durée (sans S9) doit disposer de son propre témoin positif, étant donné que la durée du traitement sera différente de celle de l'essai ayant recours à une activation métabolique. Si un clastogène est sélectionné comme témoin positif unique pour le traitement de courte durée avec et sans activation métabolique, un aneugène devra être sélectionné pour le traitement de longue durée sans activation métabolique. Les témoins positifs tant pour la clastogénicité que pour l'aneugénicité sont utilisés pour des cellules métaboliquement compétentes ne nécessitant pas de préparation S9.

Chaque témoin positif doit être utilisé à une ou plusieurs concentrations devant normalement donner lieu à une augmentation reproductible et détectable par rapport à la valeur de fond afin de démontrer la sensibilité du système d'essai (c'est-à-dire que les effets sont nets mais que l'identité des lames codées n'est pas évidente pour l'examinateur), et la réponse ne doit pas être compromise par une cytotoxicité supérieure aux limites fixées dans la présente méthode d'essai.

▼M7

Tableau 1

Produits chimiques de référence recommandés pour la vérification des compétences du laboratoire et pour la sélection des témoins positifs

Catégorie	Produit chimique	Numéro CAS
1. **Clastogènes actifs sans activation métabolique**		
	Méthanesulfonate de méthyle	66-27-3
	Mitomycine C	50-07-7
	Oxyde de nitro-4-quinoléine	56-57-5
	Cytosine arabinoside	147-94-4
2. **Clastogènes nécessitant une activation métabolique**		
	Benzo(a)pyrène	50-32-8
	Cyclophosphamide	50-18-0
3. **Aneugènes**		
	Colchicine	64-86-8
	Vinblastine	143-67-9

MODE OPÉRATOIRE

Déroulement du traitement

Afin d'augmenter au maximum la probabilité de détecter une action aneugène ou clastogène à un stade précis du cycle cellulaire, il importe qu'un nombre suffisant de cellules représentant la totalité des stades de leur cycle cellulaire soit traité avec le produit chimique d'essai. Toutes les applications débutent et s'achèvent pendant la phase de croissance exponentielle des cellules, et les cellules poursuivent leur croissance jusqu'au moment de l'échantillonnage. Le déroulement du traitement pour les lignées cellulaires et les cultures de cellules primaires peut donc différer quelque peu de celui appliqué pour les lymphocytes qui nécessitent une stimulation mitogène pour débuter leur cycle cellulaire (17). En ce qui concerne les lymphocytes, l'approche la plus efficace consiste à commencer le traitement avec le produit chimique d'essai 44 à 48 heures après la stimulation par la PHA, au moment où les cellules se divisent de manière asynchrone (6).

Les données publiées (19) indiquent que la plupart des aneugènes et clastogènes sont détectés à l'issue d'une application de courte durée, comprise entre 3 et 6 heures, en présence et en l'absence de préparation S9, suivie du retrait du produit chimique d'essai et d'une période de croissance équivalente à 1.5 à 2.0 fois la durée normale du cycle cellulaire (7).

Toutefois, pour une évaluation complète, laquelle serait nécessaire pour conclure à un résultat négatif, les trois conditions expérimentales suivantes doivent être respectées pour un traitement de courte durée avec et sans activation métabolique et pour un traitement de longue durée sans activation métabolique (voir paragraphes 56, 57 et 58):

— Les cellules sont exposées au produit chimique d'essai sans activation métabolique pendant 3 à 6 heures puis sont prélevées à l'issue d'une période équivalente à 1.5 à 2.0 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement (19),

— Les cellules sont exposées au produit chimique d'essai avec activation métabolique pendant 3 à 6 heures puis sont prélevées à l'issue d'une période équivalente à 1.5 à 2.0 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement (19),

▼M7

— Les cellules sont exposées en continu sans activation métabolique jusqu'au moment du prélèvement à l'issue d'une période équivalente à 1.5 à 2.0 fois la durée normale du cycle cellulaire.

Si l'une de ces conditions expérimentales entraîne une réponse positive, il n'est pas forcément nécessaire d'étudier les autres régimes de traitement.

S'il est connu ou supposé que le produit chimique d'essai affecte la durée du cycle cellulaire (par exemple si l'essai porte sur des analogues de nucléosides), notamment en ce qui concerne les cellules compétentes en p53 (35) (36) (77), les périodes d'échantillonnage et de récupération peuvent être prolongées d'une durée équivalente à 1,5 à 2,0 fois la durée normale du cycle cellulaire (soit au total 3,0 — 4,0 cycles cellulaires après le début des traitements de courte durée et de longue durée). Ces différents choix sont à faire en fonction des craintes d'interaction entre le produit chimique d'essai et la cytoB. En cas de recours à des périodes d'échantillonnage étendues (soit une durée de mise en culture équivalente au total à 3,0 — 4,0 cycles cellulaires), il faut veiller à ce que les cellules se divisent toujours activement. En ce qui concerne les lymphocytes, par exemple, la croissance exponentielle peut diminuer à partir de 96 heures après la stimulation et les cultures cellulaires monocouches peuvent devenir confluentes.

Les déroulements proposés pour le traitement des cellules sont résumés dans le tableau 2. Ces déroulements de traitement généraux peuvent être modifiés (et doivent être justifiés) en fonction de la stabilité et de la réactivité du produit chimique d'essai, ou des caractéristiques de croissance des cellules utilisées.

Tableau 2

Traitement des cellules et temps de récolte pour le test MNvit

Lymphocytes, cellules primaires et lignées cellulaires traités avec application de cytoB	(avec S9) Traitement de courte durée	Traiter pendant 3 à 6 heures en présence de S9; éliminer la préparation S9 et le milieu de traitement; ajouter du milieu frais et de la cytoB; récolter à l'issue de 1.5 — 2.0 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement.
	(sans S9) Traitement de courte durée	Traiter pendant 3 à 6 heures; éliminer le milieu de traitement; ajouter du milieu frais et de la cytoB; récolter à l'issue de 1.5 — 2.0 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement.
	(sans S9) Traitement prolongé	Traiter pendant 1.5 — 2 fois la durée normale du cycle cellulaire en présence de cytoB; récolter à la fin de la période de traitement.
Lignées cellulaires traitées sans application de cytoB (Mode de traitement identique à celui décrit ci-dessus, sauf que l'on n'ajoute pas de cytoB)		

Il est possible que les cultures monocouches présentent des cellules mitotiques (reconnaissables à leur forme ronde et se détachant de la surface) à l'issue du traitement de 3 à 6 heures. Ces cellules se détachant facilement de la culture, elles risquent d'être emportées lors de l'élimination du milieu contenant le produit chimique d'essai. Si l'on constate une augmentation substantielle du nombre de cellules mitotiques par rapport aux témoins, ce qui indiquerait l'arrêt probable de la mitose, les cellules doivent être récoltées par centrifugation puis réintroduites dans les cultures, afin d'éviter de perdre les cellules en phase de mitose, et présentant un risque de micronoyaux / d'aberration chromosomique, au moment de la récolte.

▼M7

Récolte des cellules et préparation des lames

Chaque culture doit faire l'objet d'une récolte et d'un traitement séparés. La préparation des cellules peut comporter un traitement hypotonique, mais cette étape n'est pas indispensable si les cellules sont correctement étalées d'une autre façon. Différentes techniques peuvent être employées pour la préparation des lames, à condition que les préparations cellulaires obtenues pour l'examen soient de très bonne qualité. On retiendra les cellules dotées d'une membrane intacte et d'un cytoplasme intact pour permettre la détection d'éventuels micronoyaux et (dans la méthode du blocage de la cytokinèse) le repérage fiable des cellules binucléées.

Les lames peuvent être colorées par différentes méthodes, au Giemsa ou à l'aide de colorants fluorescents spécifiques de l'ADN, par exemple. Le recours à des 'utilisation de colorants fluorescents appropriés [par exemple, l'acridine orange (78) ou l'Hoechst 33258 avec la pyronine-Y (79)] permet d'éliminer une partie des artefacts associés avec l'utilisation d'un colorant non spécifique de l'ADN. Les anticorps anti-kinétochore, la méthode FISH associée à des sondes ADN pancentromériques ou encore le marquage in situ par amorçage à l'aide d'amorces pancentromériques, avec un colorant de contraste de l'ADN approprié, peuvent être utilisés pour identifier le contenu des micronoyaux (les chromosomes entiers seront colorés tandis que les fragments de chromosomes acentriques ne le seront pas) si les informations d'ordre mécanistique concernant leur formation présentent de l'intérêt (16) (17). D'autres méthodes de discrimination des effets clastogènes et aneugènes peuvent être utilisées, à condition que leur efficacité ait été prouvée et validée. Ainsi, pour certaines lignées cellulaires, la mesure des noyaux sub-2N en tant qu'événements hypodiploïdes à l'aide de techniques telles que l'analyse d'images, la cytométrie à balayage laser ou la cytométrie en flux pourrait également fournir des informations utiles (80) (81) (82). Les observations morphologiques des noyaux pourraient aussi donner des indications sur une aneuploïdie éventuelle. De plus, un essai d'aberrations chromosomiques dans les cellules en métaphase, portant de préférence sur le même type de cellules et suivant un protocole d'une sensibilité comparable, pourrait également se révéler utile pour déterminer si les micronoyaux sont dus à une cassure chromosomique (sachant qu'une perte chromosomique ne serait pas détectée au cours de l'essai d'aberration chromosomique).

Analyse

Toutes les lames, y compris celles des témoins de solvant et des témoins non traités (s'il y en a) et positifs, doivent être codées indépendamment avant l'analyse au microscope des fréquences de micronoyaux. Il convient d'employer des techniques appropriées pour contrôler les biais ou dérives en cas d'utilisation d'un système d'analyse automatique tel que la cytométrie en flux, la cytométrie à balayage laser ou l'analyse d'images. Quelle que soit la plate-forme automatisée utilisée pour examiner les micronoyaux, le CBPI, le RI, le RPD et la RICC doivent être évalués simultanément.

Dans les cultures traitées à la cytoB, la fréquence des micronoyaux est analysée dans un minimum de 2 000 cellules binucléées par concentration et par témoin (83), réparties équitablement entre les répliques, lorsque les cultures ont été réalisées en plusieurs exemplaires ou répliques. Lorsque des cultures en un seul exemplaire sont utilisées pour chaque concentration (voir paragraphe 28), il y a lieu d'examiner au moins 2 000 cellules binucléées par culture (83). Si le nombre de cellules binucléées disponibles pour l'examen de chaque concentration est largement inférieur à 1 000 par culture (pour les cultures dupliquées) ou à 2 000 (pour une culture en un seul exemplaire), et si aucune augmentation significative du nombre de micronoyaux n'est détectée, l'essai devra être renouvelé sur un nombre plus important de cellules, ou à des concentrations moins cytotoxiques, suivant la situation. Il convient également de veiller à ne pas examiner les cellules binucléées ayant une forme irrégulière ou dont les deux noyaux présentent une différence de taille trop importante. En outre, les cellules binucléées ne doivent pas être confondues avec des cellules multinucléées mal étalées. Les cellules possédant plus de deux noyaux principaux ne sont pas analysées, car la fréquence de référence des micronoyaux est susceptible d'être plus élevée dans ce type de cellules (84). L'examen des cellules mononucléées peut être envisagé s'il s'avère que le produit chimique d'essai interfère avec l'action de la cytoB. Dans ce cas, il peut se révéler utile de répéter l'essai sans

▼M7

cytoB. L'examen des cellules mononuclées outre celui des cellules binucléées pourrait fournir des informations utiles (85) (86), mais n'est pas obligatoire.

En ce qui concerne les lignées cellulaires, lorsque l'essai est réalisé sans cytoB, l'examen des micronoyaux doit porter sur un minimum de 2 000 cellules par concentration d'essai (83) et par témoin, réparties équitablement entre les répliques, lorsque les cultures ont été réalisées en plusieurs exemplaires. Lorsque des cultures en un seul exemplaire sont utilisées pour chaque concentration (voir paragraphe 28), il y a lieu d'examiner au moins 2 000 cellules binucléées par culture. Si le nombre de cellules binucléées disponibles pour l'examen de chaque concentration est largement inférieur à 1 000 par culture (pour les cultures dupliquées) ou à 2 000 (pour une culture en un seul exemplaire), et si aucune augmentation significative du nombre de micronoyaux n'est détectée, l'essai devra être renouvelé sur un nombre plus important de cellules, ou à des concentrations moins cytotoxiques, suivant la situation.

Lorsque l'essai est réalisé en présence de cytoB, il convient de déterminer un CBPI ou un indice de réplication (RI) afin d'évaluer la prolifération cellulaire (voir appendice 2), en utilisant 500 cellules au moins par culture. Lorsque les traitements sont effectués en l'absence de cytoB, il est essentiel de faire la preuve que les cellules en culture se sont divisées (voir paragraphes 24 à 28).

Compétence du laboratoire

Afin d'acquérir une expérience suffisante de l'essai avant de l'utiliser en routine, le laboratoire doit avoir réalisé une série d'expériences avec des produits chimiques positifs de référence agissant selon des mécanismes variés (au moins un avec activation métabolique et un sans activation métabolique, et un agissant selon un mécanisme aneugène, et sélectionné parmi les produits chimiques énumérés au tableau 1) et avec plusieurs témoins négatifs (y compris des cultures non traitées et divers solvants/véhicules). Ces réponses de témoins positifs et négatifs doivent être cohérentes par rapport à la littérature. Cette exigence ne s'applique pas aux laboratoires possédant déjà une expérience, c'est-à-dire qui disposent d'une base de données historiques telle que définie aux paragraphes 49 à 52.

Une sélection de produits chimiques utilisées comme témoins positifs (voir tableau 1) doit être testée dans le cadre de traitements de courte et de longue durée en l'absence d'activation métabolique, ainsi que dans le cadre d'un traitement de courte durée en présence d'une activation métabolique, l'objectif étant de démontrer que le laboratoire possède la compétence nécessaire pour détecter les produits chimiques clastogènes et aneugènes, déterminer l'efficacité du système d'activation métabolique et démontrer la pertinence des procédures d'examen (analyse visuelle au microscope, cytométrie en flux, cytométrie à balayage laser ou analyse d'images). Il conviendra de définir une plage de concentrations des produits chimiques sélectionnés qui permette d'obtenir des augmentations reproductibles et liées à la concentration par rapport aux valeurs de fond, afin de démontrer la sensibilité et la plage dynamique du système d'essai.

Données historiques

Le laboratoire doit établir:

— une plage et une distribution des témoins positifs historiques,

— une plage et une distribution des témoins négatifs (non traités, de solvant) historiques.

Lors de l'acquisition initiale de données en vue d'établir une distribution des témoins négatifs historiques, les données des témoins négatifs concomitants doivent être cohérentes avec les données publiées, lorsqu'elles existent. Puis, à mesure que de nouvelles données expérimentales viennent étoffer la plage de distribution des témoins, les données des témoins négatifs concomitants doivent idéalement se situer dans les limites de contrôle à 95 % de cette distribution (87) (88). La base de données historiques du laboratoire relatives aux témoins négatifs doit à l'origine être constituée à partir d'au moins 10 expériences, sachant qu'il serait préférable qu'elle en compte au moins 20, réalisées dans des conditions expérimentales similaires. Les laboratoires doivent utiliser des méthodes de contrôle de la qualité telles que des graphiques statistiques (cartes C ou cartes

▼M7

X-barre, par exemple (88)) afin de déterminer la variabilité de leurs données de témoins positifs et négatifs et de démontrer leur maîtrise de la méthodologie (83). On trouve dans la littérature (87) d'autres recommandations sur la façon de constituer et d'utiliser les données historiques (critères d'inclusion et d'exclusion des données dans la base et critères d'acceptabilité pour une expérimentation donnée).

Toute modification du protocole expérimental doit être étudiée en termes de cohérence des données avec les bases de données historiques existantes du laboratoire. Toute incohérence majeure doit conduire à l'établissement d'une nouvelle base de données des témoins historiques.

Les données des témoins négatifs désignent l'incidence des cellules micronucléées issues d'une seule culture ou de l'ensemble des cultures réalisées en plusieurs exemplaires, comme décrit au paragraphe 28. Les témoins négatifs concomittants se situent idéalement dans les limites de contrôle à 95 % de la distribution des données historiques des témoins négatifs contenues dans la base de données du laboratoire (87) (88). Lorsque les données des témoins négatifs concomitants se situent en dehors des limites de contrôle à 95 %, leur inclusion dans la distribution des témoins historiques peut être acceptable à condition que ces données ne soient pas exagérément extrêmes et qu'il soit prouvé que le système d'essai est «sous contrôle» (voir paragraphe 50) et qu'il n'y a pas eu de défaillance technique ou d'erreur humaine.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Présentation des résultats

Lorsque la technique du blocage de la cytokinèse est employée, seules les fréquences des cellules binucléées présentant des micronoyaux (indépendamment du nombre de micronoyaux par cellule) sont utilisées pour évaluer l'induction de micronoyaux. L'analyse des cellules présentant un ou plusieurs micronoyaux peut être rapportée séparément; elle peut apporter des informations utiles, mais n'est pas obligatoire.

Il convient d'effectuer des mesures parallèles de cytotoxicité et/ou de cytostase pour toutes les cultures traitées et les témoins négatifs et positifs (16). On calculera également le CBPI ou l'indice de réplication (RI) pour toutes les cultures traitées et témoins, afin de mesurer le retard du cycle cellulaire en cas de recours à la méthode de blocage de la cytokinèse. En l'absence de cytoB, il convient de mesurer le doublement relatif de la population (RPD) ou l'augmentation relative du nombre de cellules (RICC) (voir appendice 2).

Les données doivent être indiquées individuellement pour chaque culture. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux.

Critères d'acceptabilité

L'acceptation de l'essai repose sur les critères suivants:

— Les données relatives aux témoins négatifs concomitants sont considérées comme pouvant être ajoutées à la base de données des témoins négatifs historiques du laboratoire (voir paragraphe 50).

— Les témoins positifs concomitants (voir paragraphe 50) induisent des réponses compatibles avec celles générées dans la base de données des témoins positifs historiques et produisent une augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins négatifs concomitants

— Les critères de prolifération cellulaire dans le témoin de solvant sont remplis (voir paragraphes 25-27)

— Toutes les conditions expérimentales ont été testées, à moins que l'une d'entre elles ait abouti à des résultats positifs (voir paragraphes 36-40).

— Un nombre adéquat de cellules et de concentrations sont analysables (voir paragraphes 28 et 44-46).

▼M7

— Les critères de sélection de la concentration maximale sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 24-31.

Évaluation et interprétation des résultats

À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si, dans les conditions expérimentales étudiées (voir paragraphes 36-39):

— au moins une des concentrations d'essai présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant (89)

— un test de tendance approprié montre que l'augmentation est liée à la dose dans au moins une condition expérimentale (voir paragraphe 28)

— des résultats se situent à l'extérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson, par exemple; voir paragraphe 52).

Le produit chimique d'essai est alors considéré comme incapable d'induire des cassures chromosomiques et/ou un gain ou une perte chromosomique dans ce système d'essai. Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont également disponibles dans la littérature (90) (91) (92).

À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si, dans toutes les conditions expérimentales étudiées (voir paragraphes 36-39)

— aucune concentration d'essai ne présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant,

— un test de tendance approprié montre qu'il n'y a pas d'augmentation liée à la concentration,

— l'intégralité des résultats se situe à l'intérieur de la distribution des données des témoins négatifs historiques (limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson, par exemple voir paragraphe 52).

Le produit chimique d'essai est alors considéré comme incapable d'induire des cassures chromosomiques et/ou un gain ou une perte chromosomique dans ce système d'essai. Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont également disponibles dans la littérature (90) (91) (92).

Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse clairement positive ou négative.

Lorsque la réponse n'est ni clairement négative ni clairement positive, tel que décrit ci-dessus, ou en vue d'établir la signification biologique d'un résultat, les données doivent être soumises à un jugement d'expert et/ou des investigations plus poussées. Il peut être utile d'examiner des cellules supplémentaires (le cas échéant) ou de répéter l'expérience, éventuellement dans des conditions expérimentales modifiées [espacement des concentrations, autres conditions d'activation métabolique (concentration de S9 ou origine de S9), par exemple].

Dans de rares cas, même après des études complémentaires, l'ensemble de données ne permettra pas de conclure à un résultat positif ou négatif, et le résultat sera déclaré équivoque.

Lorsque des produits chimiques d'essai induisent la formation de micronoyaux lors de l'essai MNvit, celle-ci est due soit à une cassure chromosomique, soit à une perte chromosomique, soit aux deux évènements combinés. Il est possible de procéder à d'autres analyses à l'aide d'anticorps anti-kinétochores, de sondes centromériques in situ ou d'autres méthodes afin de déterminer si le mécanisme d'induction de micronoyaux est le résultat d'une activité clastogène et/ou aneugène.

▼M7

Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes:

Produit chimique d'essai:

— source, numéro de lot et date limite d'utilisation, si c'est disponible;

— stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue;

— réactivité du produit chimique d'essai avec le solvant/véhicule ou le milieu de culture cellulaire;

— solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant, si elles sont connues;

— mesure du pH, de l'osmolalité et de la précipitation dans le milieu de culture auquel le produit chimique d'essai a été ajouté, le cas échéant.

Substance mono-constituant:

— apparence physique, hydro-solubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude;

— identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges:

— caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants.

Solvant:

— justification du choix du solvant;

— pourcentage de solvant dans le milieu de culture final

Cellules:

— type et source des cellules utilisées;

— raisons du choix du type cellulaire utilisé;

— absence de mycoplasmes, pour les lignées cellulaires;

— pour les lignées cellulaires, informations sur la durée du cycle cellulaire ou l'indice de prolifération;

— en cas d'utilisation de lymphocytes, sexe, âge et toute autre information pertinente sur les donneurs de sang, sang complet ou lymphocytes isolés, mitogène employé;

— durée normale du cycle cellulaire (témoin négatif);

— nombre de passages, le cas échéant, pour les lignées cellulaires;

— méthodes d'entretien des cultures cellulaires, pour les lignées cellulaires;

— nombre modal de chromosomes, pour les lignées cellulaires;

▼M7

Conditions de l'essai:

— identité de l'éventuel agent de blocage de la cytokinèse utilisé (cytoB, par exemple), sa concentration et la durée d'exposition des cellules;

— concentration du produit chimique d'essai sous la forme de sa concentration finale dans le milieu de culture (par exemple en µg ou mg/ml ou mM du milieu de culture);

— justification du choix des concentrations et du nombre de cultures, y compris données concernant la cytotoxicité et les limites de solubilité, par exemple;

— composition du milieu, concentration de CO2 le cas échéant, degré d'humidité;

— concentration (et/ou volume) de solvant et de produit chimique d'essai ajoutée au milieu de culture;

— température et temps d'incubation;

— durée du traitement;

— délai de récolte après traitement;

— densité cellulaire au moment de l'ensemencement, le cas échéant;

— type et composition du système d'activation métabolique (source du S9, méthode de préparation du mélange S9, concentration ou volume de mélange S9 et de S9 dans le milieu de culture final, contrôles de la qualité du S9 (activité enzymatique, stérilité, capacité métabolique, par exemple);

— produits chimiques témoins positifs et négatifs, concentrations finales, conditions et durée des périodes de traitement et de récupération;

— méthodes de préparation des lames et technique de coloration utilisées;

— critères d'analyse des cellules micronucléées (choix des cellules analysables et identification du micronoyau);

— nombre de cellules analysées;

— méthodes de mesure de la cytotoxicité;

— toute information supplémentaire concernant la cytotoxicité et la méthode utilisée;

— critères pour conclure que l'étude est positive, négative ou équivoque;

— méthode(s) d'analyse statistique utilisée(s);

— méthodes, telles que le recours aux anticorps anti-kinétochores ou aux sondes centromériques, utilisées pour déterminer si les micronoyaux possèdent des chromosomes entiers ou fragmentés, le cas échéant;

— méthodes utilisées pour déterminer le pH, l'osmolalité et la précipitation.

Résultats:

— définition des cellules acceptables pour l'analyse;

— en l'absence de cytoB, nombre de cellules exposées et nombre de cellules récoltées pour chaque culture en cas de lignées cellulaires;

▼**M7**

— mesures de la cytotoxicité, par exemple CBPI ou RI dans le cas de la méthode de blocage de la cytokinèse; RICC ou RPD lorsque la méthode de blocage de la cytokinèse n'est pas utilisée; autres observations le cas échéant (degré de confluence cellulaire, apoptose, nécrose, numération des cellules en métaphase, fréquence des cellules binucléées);

— signes de précipitation et moment de la détermination;

— données sur le pH et l'osmolalité du milieu de traitement, si elles ont été déterminées;

— répartition des cellules mono-, bi- et multinucléées en cas d'utilisation d'une méthode de blocage de la cytokinèse;

— nombre de cellules micronucléées, donné séparément pour chaque culture traitée et culture témoin, en précisant si elles proviennent de cellules binucléées ou mononucléées, s'il y a lieu;

— relation concentration-réponse, si possible;

— données relatives aux témoins négatifs (solvant) et positifs (concentrations et solvants) concomitants;

— données relatives aux témoins négatifs (avec solvant) et positifs historiques, y compris ordres de grandeur, moyennes, écarts-types, limites de contrôle à 95 % pour la distribution, et nombre de données;

— analyse statistique; valeurs p le cas échéant.

Discussion des résultats.

Conclusions.

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (2016), «Overview of the set of OECD Genetic Toxicity Test Guidelines and updates performed in 2014-2015». Publications ENV. Série sur les essais et l'évaluation n° 234, OCDE, Paris.

(2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 1-4.

(3) Parry, J.M., A. Sors (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 3-15.

(4) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios,* Vol. 43/172-173, pp. 233-246.

(5) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 167-172.

(6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols,* Vol. 2/5, pp. 1084-1104.

(7) Fenech, M., A.A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research,* Vol. 161/2, pp. 193-198.

(8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 13/1, pp. 34-43.

▼M7

(9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research,* Vol. 234/5, pp. 9-20.

(10) Miller, B.M. *et al*. (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis,* Vol. 6/4, pp. 297-302.

(11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis,* Vol. 8/4, pp. 329-334.

(12) Migliore, L. *et al*. (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research,* Vol. 319/3, pp. 205-213.

(13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by anti-kinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis,* Vol. 8/6, pp. 519-525.

(14) Eastmond, D.A, D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research,* Vol. 322/1, pp. 9-20.

(15) Marshall, R.R. *et al*. (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research,* Vol. 372/2, pp. 233-245.

(16) Zijno, P. *et al*. (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 372/2, 211-219.

(17) Kirsch-Volders *et al*. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research,* Vol. 540/2, pp. 153-163.

(18) Chapitre B.10 de la présente annexe*: Essai in vitro d'aberration chromosomique sur cellules de mammifère*.

(19) Lorge, E. *et al*. (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 13-36.

(20) Clare, G. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 37-60.

(21) Aardema, M.J. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 61-87.

(22) Wakata, A. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 88-124.

(23) Oliver, J. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 125-152.

(24) Albertini, S. *et al*. (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 187-208.

(25) Miller, B. *et al*. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 45-59.

▼**M7**

(26) Miller, B. *et al*. (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research,* Vol. 410, pp. 81-116.

(27) Kalweit, S. *et al*. (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells — comparison of three different test approaches. *Mutation Research,* Vol. 439/2, pp. 183-190.

(28) Kersten, B. *et al*. (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research,* Vol. 445/1, pp. 55-71.

(29) von der Hude, W. *et al*. (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells — results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Res*earch, Vol. 468/2, pp. 137-163.

(30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* Vol. 517/1-2, pp. 123-134.

(31) Matsushima, T. *et al*. (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis,* Vol. 14/6, pp. 569-580.

(32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 1-152.

(33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro*micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Res*earch, Vol. 702/2, pp. 139-147.

(34) Hashimoto K. *et al*. (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacol*ogy, Vol. 59/1, pp. 28-36.

(35) Honma, M., M. Hayashi (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 373-384.

(36) Zhang, L.S. *et al*. (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters,* Vol. 347/3-4, pp. 105-115.

(37) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16-17 November 2006, disponible à l'adresse: http:// ecvam.jrc.it/index.htm.

(38) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. disponible à l'adresse: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(39) Corvi, R. *et al*. (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis,* Vol 23/4, pp. 271-283.

(40) ILSI paper (draft). Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research.*

▼**M7**

(41) Scott, D. *et al*. (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research,* Vol. 257/2, pp. 147-205.

(42) Morita, T. *et al*. (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research,* Vol. 268/2, pp. 297-305.

(43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789-886.

(44) Long, L.H. *et al*. (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutation Research,* Vol. 634/1-2, pp. 177-183.

(45) Nesslany, F. *et al*. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation.*, Vol. 49, pp. 439-452.

(46) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 147/1-2, pp. 29-36.

(47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research,* Vol. 392, pp. 11-18.

(48) Payne, C.M. *et al*. (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, pp. 825-840.

(49) Bazin, E. *et al*. (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin,Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, pp. 251-259.

(50) Le Hegarat, L. *et al*. (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cellsby the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, Vol. 25/6, pp. 555-560.

(51) Josse, R. *et al*. (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 295-304.

(52) Ehrlich, V. *et al*. (2002). Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis,* Vol. 17/3, pp. 257-260.

(53) Knasmüller, S. *et al*. (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology,* Vol. 198/1-3, pp. 315-328.

(54) Gibson, D.P. *et al*. (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 61-70.

(55) Bonassi, S. *et al*. (2001). HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. **37/1**, pp. 31-45.

(56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research,* Vol. 113/3-4, pp. 173-215.

(57) Ong, T.-m. *et al*. (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, pp. 55-65.

▼M7

(58) Elliott, B.M. *et al*. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis,* Vol. 7, pp. 175-177.

(59) Matsushima, T. *et al*. (1976). «A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems», in *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres, F.J. *et al*. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(60) Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28, pp. 51-59.

(61) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Disponible à l'adresse: http://www.pops.int/

(62) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, Vol.190/3, pp. 225-8.

(63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982). «CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids», in Genotoxic Effects of Airborne Agents. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.

(64) Zamora, P.O. *et al*. (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.

(65) Asakura, M. *et al*. (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.

(66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research,* Vol. 285/1, pp. 35-44.

(67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* Vol. 521/1-2, pp. 103-112.

(68) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2004). Corrigendum to «Report from the *in vitro* micronucleus assay working group». *Mutation Research,* 564, 97-100.

(69) Lorge, E. *et al*. (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research,* Vol. 655/1-2, pp. 1-3.

(70) Surralles, J. *et al*. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 341/3, pp. 169-184.

(71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 724, pp. 86-87.

(72) Pfuhler, S. *et al*. (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 101-107.

(73) OCDE (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). ENV/JM/TG(2014)17. Disponible sur demande.

▼M7

(74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 741, pp. 32-56.

(75) Brookmire L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36-43.

(76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(77) Sobol, Z. *et al*. (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research*, Vol.746/1, pp. 29-34.

(78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research,* Vol. 120/4, pp. 241-247.

(79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research,* Vol. 120/4, pp. 269-275.

(80) Bryce, S.M. *et al*. (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/4, pp. 280–286.

(81) Nicolette, J. *et al*. (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 355–362.

(82) Shi, J., R. Bezabhie, A. Szkudlinska (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, Vol. 25/1, pp. 33-40.

(83) OCDE (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de OECD, Série sur les essais et l'évaluation, n°198, OCDE, Paris.

(84) Fenech, M. *et al*. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 534/1-2, pp. 65-75.

(85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, Vol. 13/2, pp. 193-8.

(86) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, Vol. 85/8, pp. 873-99.

(87) Hayashi, M. *et al*. (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.723/2, pp. 87-90.

(88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). «*In vitro* micronucleus test», in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2nd ed. Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 463-467.

(90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.

(91) Galloway, S.M. *et al*. (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

▼**M7**

(92) Richardson, C. *et al*. (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays. in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

▼M7

Appendice 1

DÉFINITIONS

Aneugène: produit chimique ou processus qui, via des interactions avec les composants de la cellule mitotique ou méiotique lors de la division cellulaire, provoque la formation de cellules ou d'organismes aneuploïdes.

Aneuploïdie: tout écart par rapport au nombre diploïde (ou haploïde) normal de chromosomes, d'un seul ou de plusieurs chromosomes, mais non d'un ou de plusieurs jeux de chromosomes (polyploïdie).

Apoptose: mort cellulaire programmée caractérisée par une succession d'étapes menant à la désintégration des cellules en particules membranaires qui sont ensuite éliminées par phagocytose ou par excrétion.

Augmentation relative du nombre de cellules (Relative increase in cell count, RICC): méthode de mesure de la cytotoxicité lorsque la cytoB n'est pas utilisée (voir formule à l'annexe 2).

Cellules en interphase: cellules qui ne sont pas en phase de mitose.

Centromère: région de l'ADN d'un chromosome où les deux chromatides sont reliées entre elles et sur laquelle les deux kinétochores sont fixés côte à côte.

Clastogène: produit chimique ou événement induisant des aberrations chromosomiques structurales dans des populations cellulaires ou des organismes eucaryotes.

Concentrations: désigne les concentrations finales du produit chimique d'essai dans le milieu de culture.

Cytokinèse: processus de division cellulaire survenant immédiatement après la mitose pour former deux cellules-filles, contenant chacune un noyau unique.

Cytostase: inhibition de la croissance cellulaire (voir formule à l'appendice 2).

Cytotoxicité: pour les essais visés par la présente méthode d'essai effectués en présence de cytochalasine B, la cytotoxicité correspond à une baisse de l'indice de prolifération des cellules dont la division cytoplasmique a été bloquée (CBPI) ou de l'indice de réplication (RI) des cellules traitées par rapport au témoin négatif (voir paragraphe 26 et appendice 2).

Pour les essais visés par la présente méthode d'essai effectués en l'absence de cytochalasine B, la cytotoxicité correspond à une baisse du doublement relatif de la population (RPD) ou de l'augmentation relative du nombre de cellules (RICC) des cellules traitées par rapport au témoin négatif (voir paragraphe 27 et appendice 2).

Doublement relatif de la population (Relative Population Doubling, RPD): méthode de mesure de la cytotoxicité lorsque la cytoB n'est pas utilisée (voir formule à l'appendice 2).

Fraction S9 de foie: surnageant d'homogénat de foie centrifugé à 9 000g (extrait de foie cru).

Génotoxique: terme générique qualifiant tous les types de lésions de l'ADN ou des chromosomes, tels que les cassures, délétions, adduits, liaisons et modifications de nucléotides, réarrangements, mutations génétiques, aberrations chromosomiques et aneuploïdies. Tous les types d'effets génotoxiques n'entraînent pas nécessairement de mutations ou de lésions chromosomiques stables.

Indice de prolifération (Proliferation Index, PI): méthode de mesure de la cytotoxicité lorsque la cytoB n'est pas utilisée (voir formule à l'appendice 2).

▼M7

Indice de prolifération des cellules dont la division cytoplasmique a été bloquée (Cytokinesis-Block Proliferation Index, CBPI): proportion de cellules issues de la deuxième division dans la population traitée par rapport au témoin non traité (voir formule à l'appendice 2).

Indice de réplication (Replication Index, RI): rapport entre le nombre de cycles de division cellulaire achevés dans une culture traitée et ce même nombre dans le témoin non traité, au cours de la période d'exposition et la récupération (voir formule à l'appendice 2).

Indice mitotique: nombre de cellules en métaphase divisé par le nombre total de cellules dans une population; une indication de la vitesse de prolifération cellulaire dans cette population.

Kinétochore: assemblage de protéines situé au niveau du centromère d'un chromosome, auquel sont associées les fibres fusoriales lors de la division cellulaire, permettant le mouvement ordonné des chromosomes-fils vers les pôles des cellules-filles.

Mélange S9: mélange de fraction S9 de foie et de cofacteurs nécessaires à l'activité des enzymes métaboliques.

Micronoyau: petit noyau, venant s'ajouter au noyau principal de la cellule et séparé de celui-ci, formé lors de la télophase de la mitose ou de la méiose à partir de chromosomes entiers ou de fragments de chromosomes retardataires.

Mitose: division du noyau cellulaire, généralement décomposée en prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase.

Mutagène: qui produit une modification héréditaire portant sur une ou plusieurs séquences de paires de bases d'ADN génique, ou sur la structure de chromosomes (aberrations chromosomiques).

Non-disjonction: non-séparation d'une paire de chromatides, qui ne parviennent donc pas à migrer correctement lors de la division cellulaire, ce qui entraîne la présence d'un nombre anormal de chromosomes dans les cellules-filles.

Polyploïdie: aberrations chromosomiques numériques dans des cellules ou des organismes, impliquant un ou plusieurs jeux de chromosomes et non un ou plusieurs chromosomes isolés (aneuploïdie).

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Prolifération cellulaire: augmentation du nombre de cellules résultant de la division cellulaire mitotique.

Statut p53: la protéine p53 intervient dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation de l'ADN. Les cellules déficientes en protéine fonctionnelle p53, incapables d'arrêter le cycle cellulaire ou d'éliminer les cellules lésées par le biais de l'apoptose ou d'autres mécanismes (induction de la réparation de l'ADN, par exemple) liés aux fonctions de p53 en réponse à des lésions de l'ADN, devraient théoriquement être davantage sujettes aux mutations génétiques ou aux aberrations chromosomiques.

Témoin de solvant: terme générique désignant les cultures témoins recevant uniquement le solvant utilisé pour dissoudre le produit chimique d'essai.

Témoin non traité: cultures ne recevant aucun traitement (ni produit chimique d'essai ni solvant) mais préparées parallèlement et de la même façon que les cultures exposées au produit chimique d'essai.

▼M7

Appendice 2

FORMULES POUR L'ÉVALUATION DE LA CYTOTOXICITÉ

En cas d'utilisation de la cytoB, l'évaluation de la cytotoxicité se fonde sur l'indice de prolifération des cellules dont la division cytoplasmique a été bloquée (CBPI) ou sur l'indice de réplication (RI) (17) (69). Le CBPI indique le nombre moyen de noyaux par cellule, et peut servir au calcul de la prolifération cellulaire. Le RI indique le nombre relatif de cycles cellulaires par cellule effectués au cours de la période d'exposition à la cytoB dans les cultures traitées par rapport aux cultures témoins, et peut servir au calcul du pourcentage de cytostase:

$$\% \text{ cytostase} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

Avec:

T = culture traitée avec le produit chimique d'essai

C = culture témoin

Où:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{Nb de cellules mononucléées}) + (2 \times \text{nb de cellules binucléées}) + (3 \times \text{Nb de cellules multinucléées}))}{(\text{nombre total de cellules})}$$

Ainsi, un CBPI égal à 1 (toutes les cellules sont mononucléées) équivaut à une cytostase de 100 %.

Cytostase = 100-RI

$$\text{RI} = \frac{((\text{nb de cellules binucléées}) + (2 \times \text{nb de cellules multinucléées}))/(\text{nombre total de cellules})_T}{((\text{nb decellules binucléées}) + (2 \times \text{nb de cellules multinucléées}))/(\text{nombre total de cellules})_C} \times 100$$

T = cultures traitées

C = cultures témoins

Ainsi, un RI de 53 % signifie que, par rapport au nombre de cellules ayant effectué une division cellulaire pour former des cellules binucléées et multinucléées dans la culture témoin, 53 % seulement de ces cellules ont effectué une division dans la culture traitée, soit une cytostase de 47 %.

En l'absence d'utilisation de cytoB, l'évaluation de la cytotoxicité sur la base de l'augmentation relative du nombre de cellules (RICC) ou du doublement relatif de la population (RPD) est recommandée (69), ces deux mesures tenant compte de la proportion de cellules ayant effectué une division cellulaire.

$$\textbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{Augmentation du nombre de cellules dans les cultures traitées}(\text{final} - \text{initial}))}{(\text{Augmentation du nombre de cellules dans les cultures témoins}(\text{final} - \text{initial}))} \times 100$$

$$\textbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{Nombre de doublements de population dans les cultures traitées})}{(\text{Nombre de doublements de population dans les cultures témoins})} \times 100$$

Où:

Doublement de population = [log (nombre de cellules post-application ÷ nombre de cellules initial)] ÷ log 2

Par exemple, une RICC ou un RPD de 53 % indique une cytotoxicité/cytostase de 47 %.

▼**M7**

En utilisant l'**indice de prolifération (PI)**, on peut évaluer la cytotoxicité via le comptage du nombre de clones composés de 1 cellule (cl1), 2 cellules (cl2), 3 à 4 cellules (cl4) et 5 à 8 cellules (cl8).

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

Le PI est également un paramètre fiable et utile de cytotoxicité pour les lignées cellulaires cultivées in vitro en l'absence de cytoB (25) (26) (27) (28) et peut être considéré comme un autre paramètre utile.

Quoi qu'il en soit, il convient de mesurer le nombre de cellules avant traitement, qui doit être identique dans les cultures traitées et les cultures témoins négatives.

Le RCC (à savoir nombre de cellules dans les cultures traitées / nombre de cellules dans les cultures témoins) était utilisé auparavant comme paramètre de cytotoxicité mais n'est plus recommandé car il peut induire une sous-estimation de la cytotoxicité.

En cas d'utilisation de systèmes d'analyse automatique tels que la cytométrie en flux, la cytométrie à balayage laser ou l'analyse d'images, le nombre de noyaux peut remplacer le nombre de cellules dans la formule.

Dans les cultures témoins négatives, le doublement de la population ou l'indice de réplication doivent être compatibles avec l'obligation de prélever des cellules à l'issue d'une période équivalente à environ 1,5 à 2 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement.

▼M3

B.50. SENSIBILISATION CUTANÉE: ESSAI DE STIMULATION LOCALE DES GANGLIONS LYMPHATIQUES: DA

INTRODUCTION

1. Les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques et les méthodes d'essai de l'Union européenne sont régulièrement mises à jour à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences réglementaires et de considérations relatives au bien-être des animaux. La première méthode d'essai (B.42) visant à déterminer la sensibilisation cutanée chez la souris, c'est-à-dire l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL, LD 429 de l'OCDE), a été mise à jour (1). Les détails de la validation de l'ELGL et une synthèse des travaux qui y sont associés ont été publiés (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). La méthode ELGL s'appuie un marquage radioisotopique par la thymidine ou l'iode pour mesurer la prolifération des lymphocytes, ce qui limite son application lorsque l'acquisition, l'utilisation et l'élimination de produits radioactifs posent problème. L'ELGL: DA (développé par Daicel Chemical Industries, Ltd.) est une variante non radioactive de l'ELGL, qui quantifie l'adénosine triphosphate (ATP) par bioluminescence pour estimer la prolifération des lymphocytes. La méthode ELGL: DA a été validée, et évaluée et recommandée par un comité international d'examen, qui a reconnu son utilité pour identifier, dans certaines limites, les substances d'essai ayant ou non un effet sensibilisant sur la peau (10) (11) (12) (13). La présente méthode d'essai permet d'évaluer le pouvoir de sensibilisation cutanée de substances chimiques (substances et mélanges) chez les animaux. Le chapitre B.6 de la présente annexe et la LD 406 de l'OCDE font appel à des essais sur cobayes, notamment l'essai de maximisation sur le cobaye et l'essai de Buehler (14). L'ELGL (chapitre B.42 de la présente annexe, LD 429 de l'OCDE) et ses deux variantes non radioactives, ELGL: DA (chapitre B.50 de la présente annexe, LD 442 A de l'OCDE) et ELGL: BrdU-ELISA (chapitre B.51 de la présente annexe, LD 442 B de l'OCDE), sont toutes plus intéressantes que les essais sur cobayes décrits dans le chapitre B.6 et la LD 406 de l'OCDE (14) en termes de réduction et de raffinement de l'utilisation des animaux.

2. À l'instar de l'ELGL, la méthode ELGL: DA s'intéresse à la phase d'induction de la sensibilisation cutanée et fournit des données quantitatives permettant d'évaluer la relation dose-effet. Par ailleurs, en détectant les sensibilisants cutanés sans recourir au radiomarquage de l'ADN, cette technique évite les risques professionnels liés à l'exposition aux rayonnements et les problèmes de gestion des déchets. En revanche, elle pourrait se traduire par une hausse du nombre de souris utilisées pour détecter les sensibilisants cutanés, entraînant néanmoins la diminution du nombre de cobayes mis à contribution à ces mêmes fins (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (14).

DÉFINITIONS

3. Les définitions utilisées sont données à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

4. La méthode ELGL: DA est une variante de l'ELGL visant à identifier les substances d'essai susceptibles d'induire une sensibilisation cutanée, dans des limites spécifiques. Cela n'implique pas que l'ELGL: DA doive systématiquement remplacer l'ELGL ou les essais sur cobayes (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (14), mais plutôt qu'il s'agit d'un outil d'une qualité égale pouvant se substituer à ces méthodes, et dont les résultats positifs et négatifs n'ont généralement plus besoin de confirmation supplémentaire (10) (11). Avant de procéder à l'essai, le laboratoire rassemble toutes les informations disponibles sur la substance d'essai, à savoir son identité et sa structure

▼M3

chimiques, ses propriétés physico-chimiques, les résultats de tous les autres essais de toxicité in vitro et in vivo, et les données toxicologiques sur des analogues de structure. Ces informations servent à déterminer s'il est pertinent d'appliquer la méthode ELGL: DA avec la substance d'essai considérée, étant donné l'incompatibilité de certains types de substances chimiques avec l'ELGL: DA (voir paragraphe 5), et aider à choisir les doses appropriées.

5. La méthode ELGL: DA, mise en œuvre in vivo, ne met donc pas un terme à l'utilisation d'animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact. Néanmoins, comparée aux essais avec cobayes (B.6, LD 406 de l'OCDE), elle est susceptible de réduire le nombre d'animaux utilisés à cette même fin (14). En outre, l'ELGL: DA propose un raffinement important (réduction du stress et de la douleur) de l'utilisation des animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact, dans la mesure où, à la différence du chapitre B.6 et de la LD 406 de l'OCDE (51), l'ELGL: DA n'est pas fondé sur le déclenchement de réactions d'hypersensibilité cutanée par une exposition de déclenchement. Malgré les avantages de l'ELGL: DA par rapport au chapitre B.6 et à la LD 406 de l'OCDE (14), certaines limites peuvent imposer de privilégier le chapitre B.6 ou la LD 406 de l'OCDE [par exemple, essai de certains métaux, résultats faussement positifs avec certaines substances irritantes pour la peau, en particulier des tensioactifs (6) (1 et chapitre B.42 de la présente annexe), solubilité de la substance d'essai.] De surcroît, certaines substances chimiques ou familles de substances d'essai comprenant des groupements fonctionnels dont il est démontré qu'ils peuvent être des facteurs de confusion (16) peuvent aussi imposer le recours aux essais avec cobayes (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (14). Il est recommandé de considérer les limites identifiées pour l'ELGL (1 et chapitre B.42 de la présente annexe) comme étant également valables pour l'ELGL: DA (10). Il se peut en outre que la méthode ELGL: DA ne convienne pas aux substances qui modifient les niveaux d'ATP (c'est-à-dire qui agissent comme inhibiteurs de l'ATP) ou perturbent la quantification précise de l'ATP intracellulaire (par exemple, présence d'enzymes dégradant l'ATP, présence d'ATP extracellulaire dans le ganglion lymphatique). Dans ces limites, l'ELGL: DA est applicable à toute substance d'essai qui ne présente pas de propriétés susceptibles d'affecter la précision de l'essai. De plus, il convient de prendre en compte l'éventualité de résultats positifs limites pour lesquels l'indice de stimulation (IS) est situé entre 1,8 et 2,5 (voir paragraphes 31-32). En effet, d'après la base de données de validation portant sur 44 substances présentant un IS $\geq$ 1,8 (voir paragraphe 6), l'ELGL: DA a correctement identifié l'ensemble des 32 sensibilisants (d'après l'ELGL), mais a donné des résultats positifs pour trois des 12 substances non sensibilisantes présentant des indices de stimulation compris entre 1,8 et 2,5 (c'est-à-dire des résultats positifs limites) (10). Cependant, comme le même ensemble de données a été utilisé pour établir les valeurs IS et pour calculer les propriétés prédictives de l'essai, les résultats indiqués pourraient surestimer les propriétés prédictives réelles.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

6. L'ELGL: DA repose sur le principe que les sensibilisants induisent une prolifération de lymphocytes dans les ganglions lymphatiques drainant le site de l'application de la substance d'essai. Cette prolifération est proportionnelle à la dose appliquée et à la puissance de l'allergène et permet d'obtenir facilement une mesure quantitative de la sensibilisation. Pour mesurer la prolifération, on compare la prolifération moyenne de chaque groupe d'essai à la prolifération moyenne du groupe témoin traité avec le véhicule (TV). On calcule le quotient de la prolifération moyenne dans chaque groupe traité sur celle du TV, pour obtenir l'indice de stimulation (IS); si cette valeur est supérieure ou égale à 1,8, on peut ensuite poursuivre

▼M3

l'évaluation du pouvoir de sensibilisation cutanée de la substance d'essai. Les procédures décrites ici s'appuient sur la quantification de l'ATP par bioluminescence (facteur connu pour être en corrélation avec le nombre de cellules vivantes) (17) pour indiquer l'augmentation du nombre de cellules en prolifération dans les ganglions lymphatiques auriculaires de drainage (18) (19). Cette technique par bioluminescence utilise l'enzyme luciférase pour catalyser la formation de lumière à partir d'ATP et de luciférine selon la réaction suivante:

$$ATP + Luciférine + O_2 \xrightarrow{Luciférase} Oxyluciférine + AMP + PP_i + CO_2 + Lumière$$

L'intensité de la lumière émise suit une pente linéaire en fonction de la concentration en ATP, et se mesure à l'aide d'un luminomètre. L'essai luciférine-luciférase constitue une méthode précise pour quantifier l'ATP et trouve de nombreuses applications (20).

DESCRIPTION DE L'ESSAI

Choix des espèces animales

7. L'espèce retenue pour cet essai est la souris. Les études de validation de l'ELGL: DA ont été menées exclusivement avec la souche CBA/J, qui sera donc privilégiée pour cet essai (12) (13). On utilise de jeunes femelles adultes, nullipares et non gravides. Au début de l'étude, les animaux sont âgés de 8 à 12 semaines et affichent une variation de poids minime entre eux n'excédant pas 20 pour cent du poids moyen. Il est aussi possible d'utiliser d'autres souches ainsi que des mâles s'il existe suffisamment d'informations démontrant l'absence de différences significatives entre les souches et/ou les sexes en ce qui concerne la réaction à l'ELGL: DA.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

8. Les souris sont hébergées par groupes (21), sauf si une raison scientifique pertinente exige un encagement individuel. La température de l'animalerie d'expérience est maintenue à 22 °C ± 3 °C. L'humidité relative atteint au moins 30 % et de préférence ne dépasse pas 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit maintenue aux alentours de 50-60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les animaux peuvent être alimentés par un régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété.

Préparation des animaux

9. Les animaux sont sélectionnés au hasard, marqués pour permettre leur identification individuelle (mais jamais sur l'oreille) et gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours avant le commencement du traitement afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire. Avant de commencer le traitement, on examine tous les animaux pour vérifier qu'ils ne présentent pas de lésions cutanées observables.

Préparation des solutions d'essai

10. Les substances d'essai solides sont dissoutes ou dispersées dans des solvants/véhicules puis diluées, s'il y a lieu, avant d'être appliquées sur l'oreille des souris. Les substances d'essai liquides peuvent être appliquées pures ou préalablement diluées. Les substances d'essai insolubles, comme celles que l'on rencontre généralement dans les dispositifs médicaux, sont soumises à une extraction forcée à l'aide d'un solvant approprié pour faire ressortir tous les composants extractibles qu'il est possible d'évaluer, avant l'application sur l'oreille des souris. Les substances d'essai sont préparées chaque jour à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'elles peuvent être stockées.

▼M3

Contrôle de la fiabilité

11. Les témoins positifs (TP) servent à démontrer le bon fonctionnement de l'essai en répondant de manière adéquate et reproductible aux sensibilisants pour lesquels l'ordre de grandeur des effets est bien connu. Il est recommandé d'inclure un TP concurrent puisqu'il démontre la capacité du laboratoire à mener chaque essai correctement, et permet d'évaluer la comparabilité et la reproductibilité intra- et interlaboratoires. Par ailleurs, dans la mesure où certaines autorités réglementaires exigent un TP dans chaque essai, les expérimentateurs sont encouragés à consulter les autorités concernées avant de mener l'ELGL: DA. En conséquence, le recours systématique à un TP concurrent est recommandé pour éviter d'avoir à réaliser des essais supplémentaires sur animaux, ce qui est parfois exigé lorsqu'un laboratoire se réfère à un TP testé périodiquement (voir paragraphe 12). Le TP doit réagir positivement à l'ELGL: DA pour un niveau d'exposition supposé accroître l'indice de stimulation d'au moins 1,8 point par rapport au groupe témoin négatif (TN). La dose de TP sera choisie de manière à ne pas entraîner d'irritation cutanée excessive ou de toxicité systémique, l'induction devant être reproductible sans être exagérée (un IS > 10 sera considéré comme excessif, par exemple). Les TP utilisés en priorité sont l'hexyl cinnamaldéhyde à 25 % (N° CAS [Chemical Abstracts Service] 101-86-0) et l'eugénol à 25 % (N° CAS 97-53-0) dans un mélange acétone/huile d'olive (4:1, v/v). Dans certains cas, d'autres substances d'essai répondant aux critères susmentionnés pourront être employées comme témoins positifs, à condition que ce choix soit correctement justifié.

12. Si l'inclusion d'un groupe TP concurrent demeure recommandée, des essais périodiques (c'est-à-dire à intervalles ≤ 6 mois) du TP peuvent dans certains cas convenir pour les laboratoires menant régulièrement (c'est-à-dire au moins une fois par mois) des ELGL: DA et disposant d'une base de données de référence montrant que le laboratoire est apte à obtenir des résultats précis et reproductibles avec les TP. La capacité d'un laboratoire à mener l'ELGL: DA est efficacement démontrée quand le TP déclenche des résultats positifs cohérents à l'issue d'un minimum de 10 essais indépendants étalés sur une période raisonnable (c'est-à-dire inférieure à un an).

13. Il convient d'inclure un groupe TP concurrent à chaque fois que le protocole de l'ELGL: DA est modifié (par exemple si des modifications interviennent au niveau du personnel qualifié, des composés et/ou réactifs utilisés pour la méthode d'essai, de l'équipement mis en œuvre, ou de la source d'animaux d'expérience), et ces changements sont documentés dans les rapports de laboratoire. Il faudra tenir compte de l'impact de ces changements sur la validité des données de la base historique pour décider de l'opportunité d'établir une nouvelle base de données afin d'évaluer la cohérence des résultats relatifs au TP.

14. Les investigateurs gardent à l'esprit que tester le TP périodiquement plutôt que systématiquement comme concurrent pèse sur la précision et l'acceptabilité des résultats négatifs obtenus à l'issue d'un essai sans TP concurrent réalisé dans l'intervalle entre chaque essai périodique du TP. Par exemple, si un essai périodique du TP donne un faux négatif, l'ensemble des résultats négatifs obtenus depuis le dernier essai de TP valable pourront être remis en question. Il faut donc soigneusement considérer les implications de telles retombées avant de décider si les TP seront des concurrents systématiques ou s'ils feront l'objet d'essais périodiques. Par ailleurs, le nombre d'animaux du groupe TP concurrent sera réduit si cela se justifie du point de vue scientifique et si le laboratoire démontre, en s'appuyant sur ses propres données historiques, que l'on peut utiliser moins de souris (22).

▼M3

15. Quoique le témoin positif soit testé dans un véhicule produisant un effet constant (par exemple acétone: huile d'olive; 4:1, v/v), certaines situations réglementaires peuvent aussi nécessiter l'utilisation d'un véhicule moins courant (mélange cliniquement ou chimiquement pertinent) (23). Si le TP concurrent est testé avec un véhicule différent de celui de la substance d'essai, il convient de mettre en place un TV indépendant pour le TP concurrent.

16. Lorsqu'il s'agit d'évaluer des substances appartenant à une classe chimique particulière, ou donnant des résultats situés dans une certaine fourchette, des substances étalons peuvent s'avérer utiles pour montrer que la méthode d'essai fonctionne correctement et permet de détecter le pouvoir de sensibilisation cutanée de ces types de substance. Les substances étalons présentent les propriétés suivantes:

— similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie des substances à tester,

— caractéristiques physiques et chimiques connues,

— données obtenues avec l'ELGL: DA,

— données obtenues avec d'autres modèles animaux et/ou l'être humain.

MODE OPÉRATOIRE

Nombre d'animaux et doses

17. On utilise au moins quatre animaux par groupe de dose, et un minimum de trois concentrations de la substance d'essai, ainsi qu'un groupe TN concurrent ne recevant que le véhicule de cette substance d'essai et un groupe TP (concurrent ou récent selon les pratiques du laboratoire, voir paragraphes 11-15). On peut envisager de tester différentes doses de TP, en particulier quand celui-ci ne fait l'objet que d'essais périodiques. Mis à part l'absence de traitement par la substance d'essai, les animaux des groupes témoins sont manipulés et traités de la même manière que les animaux des groupes d'essai.

18. La sélection des doses et du véhicule suit les recommandations données dans les références (2) et (24). Les doses successives sont normalement choisies dans une série de concentrations appropriée telle que 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2.5 %, 1 %, 0,5 %, etc. Le choix de la série utilisée est scientifiquement justifié. Le cas échéant, toutes les informations existantes d'ordre toxicologique (par exemple sur la toxicité aiguë et l'irritation cutanée), structural et physico-chimique sur la substance d'essai en question (et/ou ses analogues de structure) sont prises en compte pour choisir les trois concentrations successives de manière que la plus élevée d'entre elles offre une exposition maximale tout en évitant la toxicité systémique et/ou une irritation cutanée locale excessive (24) (25). En l'absence de telles informations, un essai préliminaire peut s'avérer nécessaire (voir paragraphes 21-24).

19. Il convient que le véhicule ne perturbe pas et n'introduise pas un biais dans les résultats du test. Il est choisi de manière à optimiser la solubilité pour obtenir la concentration la plus élevée possible dans la préparation d'une solution/suspension adaptée à l'application de la substance d'essai. Les véhicules recommandés sont le mélange acétone/huile d'olive (4:1 v/v), le N,N-diméthylformamide, la méthyléthylcétone, le propylène glycol et le diméthylsulfoxyde (6) mais d'autres véhicules pourront également être utilisés à condition que ce choix soit suffisamment étayé sur le plan scientifique. Certaines situations réclament un témoin supplémentaire, à savoir un solvant qui se justifie sur le plan clinique ou le mélange dans lequel la substance d'essai est commercialisée. L'expérimentateur veille tout particulièrement à ce que les substances hydrophiles soient incorporées à un véhicule qui mouille la peau et ne ruisselle pas immédiatement, ce qui peut nécessiter l'ajout de solubilisants appropriés (par exemple Pluronic® L92 à 1 %). Il convient donc d'éviter les véhicules totalement aqueux.

▼M3

20. Le traitement des ganglions lymphatiques de chaque souris permet d'évaluer la variabilité entre individus et de comparer statistiquement les réponses induites par la substance d'essai et par le véhicule témoin (voir paragraphe 33). En outre, il n'est envisageable de réduire le nombre d'animaux du groupe TP qu'en se fondant sur des données individuelles (22). Du reste, certaines autorités réglementaires exigent la collecte de données pour chaque animal. Relever régulièrement les données propres à chaque individu contribue au bien-être des animaux en évitant les essais dupliqués qui seraient nécessaires si les résultats obtenus d'une autre manière (par exemple avec des données par groupe d'animaux) devaient être soumis à des autorités réglementaires ayant d'autres exigences (en particulier la fourniture de données individuelles).

Essai préliminaire

21. En l'absence d'informations permettant d'estimer la concentration d'essai maximale (voir paragraphe 18), il convient d'effectuer un essai préliminaire afin de déterminer le niveau des doses adaptées à l'ELGL: DA. Cet essai préliminaire aide à quantifier la dose maximale à mettre en œuvre dans l'ELGL: DA lorsqu'on ne dispose pas d'informations sur la concentration induisant une toxicité systémique (voir paragraphe 24) et/ou une irritation cutanée locale excessive (voir paragraphe 23). Cette concentration maximum de la substance d'essai est de 100 % pour les liquides, ou la plus élevée possible pour les solides et suspensions.

22. Les conditions de l'essai préliminaire sont les mêmes que celles de l'ELGL: DA, à ceci près qu'il n'y a pas d'évaluation de la prolifération dans les ganglions lymphatiques et que l'on peut inclure moins d'animaux par groupe de dose. En effet, on suggère d'utiliser seulement un à deux individus par groupe de dose. Il convient d'examiner toutes les souris quotidiennement afin de déceler d'éventuels signes cliniques de toxicité systémique ou d'irritation locale sur le site d'application. Les poids corporels sont consignés préalablement à l'essai et juste avant la fin de l'essai (huitième jour). On examine les deux oreilles de chaque souris pour détecter la présence d'un éventuel érythème, le résultat étant noté conformément à l'échelle figurant dans le tableau 1 (25). L'épaisseur de l'oreille est mesurée à l'aide d'une jauge d'épaisseur (par exemple micromètre numérique ou jauge d'épaisseur Peacock Dial) le premier jour (avant toute application), le troisième jour (environ 48 heures après la première dose), le septième jour (24 heures avant la fin) et le huitième jour. De plus, au huitième jour cette épaisseur peut être déterminée à partir du poids d'un échantillon d'oreille, prélevé après l'euthanasie des animaux. Les irritations locales excessives se traduisent par une cotation de l'érythème ≥ 3 et/ou un épaississement de l'oreille d'au moins 25 %, quel que soit le jour de la mesure (26) (27). La dose maximale choisie pour l'étude ELGL: DA principale sera la dose immédiatement inférieure dans la série de concentrations utilisée pour l'essai préliminaire (voir paragraphe 18) qui n'induit pas une toxicité systémique et/ou une irritation cutanée locale excessive.

Tableau 1

Cotation de l'érythème

Observation	Résultat
Pas d'érythème	0
Érythème très léger (à peine perceptible)	1
Érythème bien défini	2

▼M3

Observation	Résultat
Érythème modéré à grave	3
Érythème grave (rouge violacé) à formation d'escarre empêchant la cotation de l'érythème	4

23. Outre un épaississement de l'oreille de 25 % (26) (27), une augmentation statistiquement significative de l'épaisseur de l'oreille chez les souris traitées par rapport aux individus témoins a également été utilisée pour identifier des produits irritants dans l'ELGL (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Cependant, les augmentations statistiquement significatives inférieures à 25 % ne sont pas systématiquement associées à une irritation excessive (30) (31) (32) (33) (34).

24. Les observations cliniques suivantes peuvent indiquer une toxicité systémique (35) dans le cadre d'une évaluation intégrée, et ainsi permettre d'estimer la dose maximale à utiliser dans l'ELGL: DA principal: modifications des fonctions nerveuses (par exemple, pilo-érection, ataxie, tremblements et convulsions); changements du comportement (par exemple, agressivité, activités de toilettage modifiées, changement marqué d'intensité de l'activité); troubles respiratoires (en termes de fréquence et d'intensité de la respiration, sous forme de dyspnée, halètements ou râles), et modifications de la consommation d'aliments et d'eau. En outre, l'évaluation prendra en compte les éléments suivants: signes de léthargie et/ou absence de réceptivité, et tout signe clinique autre qu'une douleur et un stress légers ou passagers; baisse du poids corporel > 5 % entre le premier et le huitième jour; mortalité. Les animaux moribonds ou montrant des signes de douleur et de stress aigus sont euthanasiés (36).

Programme expérimental de l'étude principale

25. Le programme expérimental se déroule comme suit:

— *Premier jour:* Mesurer et consigner le poids de chaque animal ainsi que toute observation clinique. Appliquer une solution aqueuse de sodium lauryl sulfate (SLS) à 1 % au dos de chaque oreille à l'aide d'un pinceau trempé dans la solution de SLS de manière à couvrir l'ensemble de la surface externe en quatre à cinq applications. Une heure après le traitement au SLS, appliquer 25 µL d'une dilution adaptée de la substance d'essai, du véhicule seul ou du TP (concurrent ou récent selon les pratiques du laboratoire, voir paragraphes 11-15), au dos de chaque oreille.

— *Deuxième, troisième et septième jours:* Répéter le prétraitement avec la solution aqueuse de SLS à 1 % puis l'application de la substance d'essai en suivant la même procédure que le premier jour.

— *Quatrième, cinquième et sixième jours:* Aucun traitement.

— *Huitième jour:* Noter le poids de chaque animal ainsi que toute observation clinique. Environ 24 à 30 heures après le début des applications du septième jour, euthanasier les animaux. Exciser les ganglions lymphatiques auriculaires de drainage de chaque oreille de souris et les placer séparément dans une solution saline tamponnée au phosphate [phosphate buffered saline] (PBS). Les détails et diagrammes relatifs à l'identification et à la dissection des ganglions lymphatiques sont présentés dans la référence (22). Pour approfondir le suivi de la réponse cutanée locale dans l'essai principal, des paramètres supplémentaires comme la cotation de l'érythème auriculaire ou les mesures de l'épaisseur de l'oreille (obtenues à l'aide d'une jauge d'épaisseur ou par pesée d'échantillons d'oreilles après nécropsie) peuvent être inclus dans le protocole d'étude.

▼M3

Préparation des suspensions cellulaires

26. Pour chaque souris, on prépare une suspension de cellules isolées provenant des ganglions lymphatiques (CGL) excisés bilatéralement en plaçant ces ganglions entre deux lames de verres sur lesquelles on exerce une légère pression pour écraser les échantillons. Après avoir vérifié que le tissu est bien étalé, séparer les deux lames. Pour disperser le tissu présent sur ces lames dans le PBS, incliner chacune d'elle au-dessus de la boîte de Pétri, puis racler le tissu avec un grattoir à cellules tout en rinçant avec la solution. Les ganglions lymphatiques des animaux TN étant petits, il convient de les traiter avec soin pour éviter tout artéfact sur les valeurs IS. Le volume total de PBS utilisé pour rincer les deux lames est de 1 mL. Homogénéiser doucement la suspension de CGL dans la boîte de Petri à l'aide du grattoir à cellules. Prélever alors une aliquote de 20 µL de suspension homogénéisée à l'aide d'une micropipette en prenant soin de ne pas capter la membrane, visible à l'œil nu, puis mélanger cette aliquote avec 1,98 mL de PBS pour obtenir un échantillon de 2 mL. Un second échantillon de 2 mL est ensuite préparé selon la même procédure de façon à en obtenir deux par animal.

Détermination de la prolifération cellulaire (quantification de l'ATP des lymphocytes)

27. Les augmentations de la teneur en ATP des ganglions lymphatiques sont déterminées par la méthode luciférine/luciférase avec un kit de mesure de l'ATP qui calcule la bioluminescence, exprimée en unités relatives de luminescence [relative luminescence unit] (RLU). Le temps écoulé entre la mise à mort de l'animal et la quantification de l'ATP pour chaque individu demeure uniforme, et ne dépasse pas environ 30 minutes, car la teneur en ATP est supposée diminuer progressivement à partir de l'euthanasie (12). Ainsi, l'ensemble des procédures entre l'excision des ganglions lymphatiques auriculaires et les mesures d'ATP seront réalisées en 20 minutes d'après un programme préétabli valable pour tous les animaux. Il convient de déterminer la luminescence due à l'ATP dans chacun des échantillons de 2 mL, soit deux mesures d'ATP par souris. La moyenne de ces résultats est alors établie et utilisée dans les calculs suivants (voir paragraphe 30).

OBSERVATIONS

Observations cliniques

28. Au moins une fois par jour, l'expérimentateur examine attentivement chaque souris afin de déceler d'éventuels signes cliniques, se traduisant par une irritation locale sur le site d'application ou une toxicité systémique. Toutes les observations sont systématiquement consignées pour chaque souris. Les programmes de suivi intègrent les critères permettant d'identifier rapidement les souris montrant des signes de toxicité systémique, d'irritation cutanée locale excessive ou de corrosion de la peau, afin qu'elles puissent être euthanasiées (36).

Poids corporels

29. Comme indiqué au paragraphe 25, le poids corporel de chaque animal est mesuré au début de l'essai et au moment programmé pour l'euthanasie.

CALCUL DES RÉSULTATS

30. Les résultats obtenus pour chaque groupe de traitement sont exprimés par un indice de stimulation (IS) moyen. Cet IS s'obtient en divisant la moyenne des RLU/souris dans chaque groupe ayant reçu la substance d'essai ou le TP par la moyenne des RLU/souris dans le groupe témoin traité avec le solvant/TV. L'IS moyen pour les TV est alors égal à 1.

▼**M3**

31. Un résultat est considéré comme positif lorsque IS ≥ 1,8 (10). Toutefois, l'intensité de la relation dose-effet, la signification statistique et la cohérence des réponses obtenues avec le solvant/véhicule et le TP constituent autant de facteurs pour décider si un résultat limite (c'est-à-dire un IS situé entre 1,8 et 2,5) est jugé positif (2) (3) (37).

32. En cas de réponse positive limite (IS entre 1,8 et 2,5), les expérimentateurs sont invités à examiner des paramètres supplémentaires comme la relation dose-effet, les manifestations de toxicité systémique ou d'irritation excessive, et, le cas échéant, la signification statistique pour définitivement conclure à un résultat positif (10). Diverses propriétés de la substance d'essai sont aussi prises en compte, parmi lesquelles une éventuelle analogie structurelle avec des sensibilisants cutanés connus, le déclenchement d'une irritation cutanée excessive chez la souris, et la nature de la relation dose-effet observée. Ces considérations, ainsi que d'autres, sont examinées en détail dans un autre document (4).

33. Le relevé des données pour chaque souris permet de déterminer statistiquement l'existence et l'intensité d'une relation dose-effet dans les résultats. Tout traitement statistique peut comprendre une évaluation de la relation dose-effet ainsi que des comparaisons des groupes d'essai convenablement adaptées (par exemple, comparaisons par paires des groupes de dose avec le groupe solvant/véhicule témoin concurrent). Les analyses statistiques peuvent notamment inclure une régression linéaire ou le test de William pour étudier la fonction dose-effet, ainsi que le test de Dunnett pour les comparaisons par paires. Pour choisir une méthode appropriée d'analyse statistique, il faut être conscient du risque d'inégalité des variances et d'autres problèmes connexes qui pourraient nécessiter une transformation des données ou une analyse statistique non paramétrique. Quoi qu'il en soit, on peut être amené à calculer les indices de stimulation et effectuer les traitements statistiques avec ou sans certains points de données (parfois appelés «valeurs aberrantes»).

RÉSULTATS ET RAPPORTS

Résultats

34. Les résultats sont récapitulés sous forme de tableau présentant les RLU pour chaque animal, la moyenne des RLU/animal pour chaque groupe, la marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) et l'indice de stimulation moyen pour chaque groupe de dose par rapport au groupe solvant/véhicule témoin concurrent.

Rapport d'essai

35. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Substance et mélanges chimique d'essai et substances et mélanges chimiques témoins:

— données d'identification (par exemple numéro CAS et numéro CE, le cas échéant; source; pureté; impuretés connues; numéro de lot),

— état physique et propriétés physico-chimiques (par exemple volatilité, stabilité, solubilité),

— s'il s'agit d'un mélange: composition et pourcentages relatifs des constituants.

Solvant/véhicule:

— données d'identification (pureté; concentration, s'il y a lieu; volume utilisé),

— justification du choix du véhicule.

▼**M3**

Animaux d'essai:

— source des souris CBA,

— état microbiologique des animaux, s'il est connu,

— nombre et âge des animaux,

— source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.

Conditions d'essai:

— source, numéro de lot, données fournies par le fabricant sur l'assurance qualité/le contrôle qualité du kit ATP,

— détails concernant la préparation et l'application de la substance d'essai,

— justification du choix des doses (y compris résultats de l'essai préliminaire, le cas échéant),

— concentrations utilisées pour le véhicule et la substance d'essai, et quantité totale de substance d'essai appliquée,

— détails concernant la nourriture et la qualité de l'eau (y compris type et source de nourriture et provenance de l'eau),

— détails concernant le programme de traitement et d'échantillonnage,

— méthodes de détermination de la toxicité,

— critères de décision concernant les études positives ou négatives,

— détails concernant tout écart par rapport au protocole et explication de la manière dont l'écart modifie la conception de l'essai et ses résultats.

Vérification de la fiabilité:

— résumé des résultats du plus récent test de fiabilité, notamment informations sur la substance d'essai, sa concentration et le véhicule utilisé,

— résultats des témoins spécifiques au laboratoire pour le TP concurrent et/ou historique ainsi que pour le TN concurrent (solvant/véhicule),

— en l'absence d'un TP concurrent, date et rapport de laboratoire du dernier essai périodique du TP, et rapport détaillant les résultats historiques du TP spécifiques au laboratoire de manière à justifier pourquoi aucun TP concurrent n'a été mis en œuvre.

Résultat:

— poids corporel de chaque souris au lancement du traitement et au moment programmé pour l'euthanasie; moyenne et marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) pour chaque groupe de dose,

— moment du déclenchement des effets et signes de toxicité, y compris l'irritation cutanée au site d'administration, pour chaque animal,

— heure de la mise à mort de l'animal et heure de la mesure d'ATP pour chaque animal,

— tableau des RLU et IS par souris pour chaque groupe de dose,

— moyenne et marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) des RLU/souris pour chaque groupe de dose, et résultats de l'analyse des valeurs aberrantes au sein de chacun d'eux,

▼M3

— indices de stimulation obtenus, et détermination appropriée de la variabilité prenant en compte les variations entre animaux à la fois dans les groupes ayant reçu la substance d'essai et dans les groupes témoins,

— relation dose-effet,

— analyses statistiques, s'il y a lieu.

Discussion des résultats:

— bref commentaire sur les résultats, analyse de la relation dose-effet et analyses statistiques, s'il y a lieu, et conclusion quant au fait de savoir si la substance d'essai doit être considérée comme un sensibilisant cutané.

BIBLIOGRAPHIE

1. OCDE (2010), Sensibilisation cutanée: essai des ganglions lymphatiques locaux, Ligne directrice n° 429, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

2. Chamberlain, M. et Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem, Toxicol., 34, 999-1002.

3. Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. et Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem, Toxicol., 34, 985-997.

4. Basketter, D.A., Gerberick, G.F. et Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327-333.

5. Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. et Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49-59.

6. ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf].

7. Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol. 34, 258-273.

8. Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol. 34, 274-286.

9. Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol. 34, 249-257.

10. ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm]

▼**M3**

11. ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

12. Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. et Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. J. Pharmacol. Toxicol. Meth., 58, 1-10.

13. Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. et Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. J. Pharmacol. Toxicol. Meth., 58, 11-26.

14. OCDE (1992), Sensibilisation de la peau, Ligne directrice n° 406, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

15. Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. et Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

16. Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. et Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

17. Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. et Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. J. Immunol. Meth., 160, 81-88.

18. Ishizaka, A., Tono-oka, T. et Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. J. Immunol. Meth., 72, 127-132.

19. Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. et Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. Biomat., 24, 27-34.

20. Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. Meth. Enzymol., 305, 346-370.

21. ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7e édition. Washington, DC: National Academies Press.

22. ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

23. McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, 71-89.

24. Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. et Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13-31.

25. OCDE (2002), Effet irritant/corrosif aigu sur la peau, Ligne directrice No. 404, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

▼**M3**

26. Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. et DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

27. ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

28. Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. et Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug. Chem. Toxicol., 21, 195-206.

29. Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. et Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83-94.

30. Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. et Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245-256.

31. Hayes, B.B. et Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug Chem. Toxicol., 22, 491-506.

32. Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. et Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60-68.

33. Vohr, H.W. et Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721-728.

34. Patterson, R.M., Noga, E. et Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023-1028.

35. ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

36. OCDE (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Série sur les essais et évaluations n° 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

37. Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. et Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J, Toxicol, Environ. Health, 53 563-79.

38. OCDE (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Série de l'OCDE sur les essais et les évaluations n° 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

▼**M3**

Appendice 1

DÉFINITIONS

Assurance qualité: procédé de gestion dans lequel le respect des normes d'essai, des obligations du laboratoire et des procédures d'enregistrement des données, ainsi que la précision du transfert des données, sont évalués par des personnes indépendantes de celles qui réalisent les essais.

Faux négatif: substance identifiée à tort comme négative ou inactive à l'issue de l'essai, alors qu'elle est en fait positive ou active.

Faux positif: substance identifiée à tort comme positive ou active à l'issue de l'essai, alors qu'elle est en fait négative ou inactive.

Fiabilité: mesure dans laquelle la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intralaboratoire et interlaboratoires (38).

Indice de stimulation (IS): paramètre d'évaluation du pouvoir de sensibilisation cutanée d'une substance d'essai, calculé comme le quotient de la prolifération mesurée dans les groupes traités sur celle du groupe témoin concurrent recevant le véhicule.

Précision: degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa pertinence. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de «concordance» pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (38).

Reproductibilité interlaboratoires: mesure du degré auquel différents laboratoires qualifiés qui emploient le même protocole et testent les mêmes substances d'essai peuvent produire des résultats similaires en termes de qualité et de quantité. La reproductibilité interlaboratoires est déterminée au cours des processus de prévalidation et de validation, et indique dans quelle mesure un essai peut être transféré sans problème entre laboratoires. On parle aussi de reproductibilité entre laboratoires (38).

Reproductibilité intralaboratoire: détermination du degré auquel divers membres du personnel qualifié d'un même laboratoire réussissent à obtenir des résultats identiques en ayant recours à un protocole spécifique à des moments différents. On parle aussi de reproductibilité au sein du laboratoire (38).

Risque: éventualité d'un effet indésirable sur la santé ou l'environnement. L'effet indésirable se manifeste uniquement lorsque le niveau d'exposition est suffisant.

Sensibilisation cutanée: processus immunologique résultant de l'exposition topique d'un sujet sensible à un allergène chimique inducteur, et qui se traduit par une réaction immunologique cutanée pouvant entraîner le développement d'une sensibilisation de contact.

Substance d'essai (également dénommée substance chimique d'essai): toute substance et tout mélange testés selon la présente méthode d'essai.

Substance étalon: substance sensibilisante ou non sensibilisante utilisée comme référence pour comparer les effets d'une substance d'essai. Une substance étalon présente les propriétés suivantes: i) source(s) régulières et fiables; ii) similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie des substances à tester; iii) caractéristiques physico-chimiques connues; iv) données confirmant les effets connus; et v) puissance connue dans l'intervalle de la réponse désirée.

Valeur aberrante: une valeur aberrante est une valeur observée qui diffère nettement des autres valeurs dans un échantillon aléatoire d'une population.

▼M3

B.51. SENSIBILISATION CUTANÉE: ESSAI DE STIMULATION LOCALE DES GANGLIONS LYMPHATIQUES: BRDU-ELISA

INTRODUCTION

1. Les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques et les méthodes d'essai de l'Union européenne sont régulièrement mises à jour à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences réglementaires et de considérations relatives au bien-être des animaux. La première méthode d'essai (B.42) visant à déterminer la sensibilisation cutanée chez la souris, c'est-à-dire l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL, LD 429 de l'OCDE) a été révisée (1) et chapitre B.42 de la présente annexe). Les détails de la validation de l'ELGL et une synthèse des travaux qui y sont associés ont été publiés (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). La méthode ELGL s'appuie sur un marquage radioisotopique par la thymidine ou l'iode pour mesurer la prolifération des lymphocytes, ce qui limite son application dans les régions où l'acquisition, l'utilisation et l'élimination de produits radioactifs posent problème. L'ELGL: BrdU-ELISA [Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ou dosage d'immunoadsorption par enzyme liée] constitue une variante non radioactive de la méthode d'essai ELGL, qui fait appel à la 5-bromo-2-désoxyuridine (BrdU) (N° CAS [Chemical Abstracts Service] 59-14-3) non radiomarquée dans un essai de type ELISA pour mesurer la prolifération des lymphocytes. La méthode ELGL: BrdU-ELISA a été validée, puis évaluée et recommandée par un groupe international d'experts indépendants, qui a reconnu son utilité pour identifier, dans certaines limites, les substances ayant ou non un effet sensibilisant sur la peau (10) (11) (12). La présente méthode d'essai permet d'évaluer le pouvoir de sensibilisation cutanée de produits chimiques (substances et mélanges) chez les animaux. Le chapitre B.6 de la présente annexe et la LD 406 de l'OCDE font appel à des essais sur cobayes, notamment l'essai de maximisation sur le cobaye et l'essai de Buehler (13). L'ELGL (chapitre B.42 de la présente annexe, LD 429 de l'OCDE) et ses deux variantes non radioactives, ELGL: BrdU-ELISA (chapitre B.51 de la présente annexe, LD 442 B de l'OCDE) et ELGL: DA (chapitre B.50 de la présente annexe, LD 442 A de l'OCDE), sont plus intéressantes que les essais sur cobayes décrits dans le chapitre B.6 et dans la LD 406 de l'OCDE (13) en termes de réduction et de raffinement de l'utilisation des animaux.

2. À l'instar de l'ELGL, la méthode ELGL: BrdU-ELISA s'intéresse à la phase d'induction de la sensibilisation cutanée et fournit des données quantitatives permettant d'évaluer la relation dose-effet. Par ailleurs, en détectant les sensibilisants cutanés sans recourir au radiomarquage de l'ADN, cette technique évite les risques professionnels liés à l'exposition aux rayonnements et les problèmes de gestion des déchets. En contrepartie, elle pourrait se traduire par une hausse du nombre de souris utilisées pour repérer les sensibilisants cutanés, entraînant néanmoins la diminution du nombre de cobayes mis à contribution à ces mêmes fins (d'après le chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (13).

DÉFINITIONS

3. Les définitions utilisées sont données à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

4. La méthode ELGL: BrdU-ELISA est une variante de l'ELGL visant à identifier les substances chimiques susceptibles d'induire une sensibilisation cutanée, dans un cadre précis. Cela n'implique pas que l'ELGL: BrdU-ELISA doive systématiquement remplacer l'ELGL classique ou les essais sur cobayes (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (13), mais plutôt qu'il s'agit d'un outil d'une qualité égale pouvant se substituer à ces méthodes, et dont les résultats positifs et négatifs n'ont généralement plus besoin de confirmation supplémentaire (10) (11). Avant de procéder à l'essai, le laboratoire rassemble toutes les informations disponibles sur la substance d'essai, à

▼M3

savoir son identité et sa structure chimiques, ses propriétés physico-chimiques, les résultats de tous les autres essais de toxicité in vitro et in vivo, et les données toxicologiques sur des analogues de structure. Ces informations servent à déterminer s'il est pertinent d'appliquer la méthode ELGL: BrdU-ELISA avec la substance d'essai considérée [étant donné l'incompatibilité de certains types de substances chimiques avec l'ELGL: BrdU-ELISA (voir paragraphe 5)], et aider à choisir les doses appropriées.

5. La méthode ELGL: BrdU-ELISA, mise en œuvre in vivo, ne met donc pas un terme à l'utilisation des animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact. Néanmoins, comparée aux essais avec cobayes (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE), elle est susceptible de réduire le nombre d'animaux utilisés à cette même fin (13). En outre, l'ELGL: BrdU-ELISA propose un raffinement important de l'utilisation des animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact, dans la mesure où, à la différence du chapitre B.6 et de la LD 406 de l'OCDE, l'ELGL: BrdU-ELISA n'est pas fondé sur le déclenchement de réactions d'hypersensibilité cutanée par une exposition de déclenchement. De plus, l'ELGL: BrdU-ELISA ne requiert aucun adjuvant, contrairement à l'essai de maximisation sur le cobaye (chapitre B.6 de la présente annexe, 13). Cette méthode permet donc de réduire le stress des animaux. Malgré les avantages de l'ELGL: BrdU-ELISA par rapport au chapitre B.6 et à la LD 406 de l'OCDE (13), certaines limites peuvent imposer de privilégier l'utilisation du chapitre B6 ou de la LD 406 de l'OCDE (13) [par exemple, essai de certains métaux, résultats faussement positifs avec certaines substances irritantes pour la peau, en particulier des tensioactifs (6) (1 et chapitre B.42 de la présente annexe), solubilité de la substance d'essai]. De surcroît, certaines substances chimiques ou familles de substances chimiques comprenant des groupements fonctionnels dont il est démontré qu'ils peuvent être des facteurs de confusion (15) peuvent aussi imposer le recours aux essais avec cobayes (B.6, LD 406 de l'OCDE) (13). Il est recommandé de considérer les limites identifiées pour l'ELGL (1 et chapitre B.42 de la présente annexe) comme étant également valables pour l'ELGL: BrdU-ELISA (10). Dans ces limites, l'ELGL: BrdU-ELISA est applicable à tout produit chimique qui ne présente pas de propriétés susceptibles d'affecter la précision de l'essai. De plus, il convient de prendre en compte l'éventualité de résultats positifs limites pour lesquels l'indice de stimulation (IS) est situé entre 1,6 et 1,9 (voir paragraphes 31-32). En effet, d'après la base de données de validation portant sur 43 substances présentant un IS $\geq$ 1,6 (voir paragraphe 6), l'ELGL: BrdU-ELISA a correctement identifié l'ensemble des 32 sensibilisants (d'après l'ELGL), mais a donné des résultats positifs pour deux des 11 substances non sensibilisantes (d'après ELGL) présentant un indice de stimulation compris entre 1,6 et 1,9 (c'est-à-dire des résultats positifs limites) (10). Cependant, comme le même ensemble de données a été utilisé pour établir les valeurs IS et pour calculer les propriétés prédictives de l'essai, les résultats indiqués pourraient surestimer les propriétés prédictives réelles.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

6. L'ELGL: BrdU-ELISA repose sur le principe que les sensibilisants induisent une prolifération primaire de lymphocytes dans les ganglions lymphatiques drainant le site de l'application de la substance d'essai. Cette prolifération est proportionnelle à la dose appliquée et à la puissance de l'allergène et permet d'obtenir facilement une mesure quantitative de la sensibilisation. Pour mesurer la prolifération, on compare la prolifération moyenne de chaque groupe d'essai à la prolifération moyenne du groupe témoin traité avec le véhicule (TV). On calcule le quotient de la prolifération moyenne dans chaque groupe traité sur celle dans le groupe TV concurrent pour obtenir l'indice de stimulation (IS); si cette valeur est supérieure ou

▼M3

égale à 1,6, on peut ensuite poursuivre l'évaluation du pouvoir de sensibilisation cutanée de la substance d'essai. Les procédures décrites ici s'appuient sur la quantification de la BrdU pour indiquer l'augmentation du nombre de cellules en prolifération dans les ganglions lymphatiques auriculaires de drainage. La BrdU est un analogue de la thymidine qui s'incorpore de la même manière dans l'ADN de cellules en prolifération. L'incorporation de la BrdU est quantifiée par ELISA, grâce à un anticorps spécifique de la BrdU marqué par la peroxydase. Cette enzyme réagit ensuite avec un substrat ajouté spécialement pour produire un composé coloré, dosé avec un lecteur de plaque de microtitrage à une absorbance donnée.

DESCRIPTION DE L'ESSAI

Choix des espèces animales

7. L'espèce retenue pour cet essai est la souris. Les études de validation de l'ELGL: BrdU-ELISA ont été menées exclusivement avec la souche CBA/JN, qui sera donc privilégiée pour cet essai (10) (12). On utilise de jeunes femelles adultes, nullipares et non gravides. Au début de l'étude, les animaux sont âgés de 8 à 12 semaines et affichent une variation de poids minime entre eux n'excédant pas 20 pour cent du poids. Il est aussi possible d'utiliser d'autres souches ainsi que des mâles s'il existe suffisamment d'informations démontrant l'absence de différences significatives entre les souches et/ou les sexes en ce qui concerne la réaction à l'ELGL: BrdU-ELISA.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

8. Les souris sont hébergées par groupes (16), sauf si une raison scientifique pertinente exige un encagement individuel. La température de l'animalerie d'expérience est maintenue à 22 °C ± 3 °C. L'humidité relative atteint au moins 30 % et de préférence ne dépasse pas 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit maintenue aux alentours de 50-60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les animaux peuvent être alimentés par un régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété.

Préparation des animaux

9. Les animaux sont sélectionnés au hasard, marqués pour permettre leur identification individuelle (mais jamais sur l'oreille) et gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours avant le commencement du traitement afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire. Avant de commencer le traitement, on examine tous les animaux pour vérifier qu'ils ne présentent pas de lésions cutanées observables.

Préparation des solutions d'essai

10. Les substances chimiques solides sont dissoutes ou dispersées dans des solvants/véhicules puis diluées, s'il y a lieu, avant d'être appliquées sur l'oreille des souris. Les substances chimiques liquides peuvent être appliquées pures ou préalablement diluées. Les substances chimiques insolubles, comme celles que l'on rencontre généralement dans les dispositifs médicaux, sont soumises à une extraction forcée à l'aide d'un solvant approprié pour faire ressortir tous les composants extractibles qu'il est possible d'évaluer, avant l'application sur l'oreille des souris. Les substances d'essai sont préparées chaque jour à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'elles peuvent être stockées.

Contrôle de la fiabilité

11. Les témoins positifs (TP) servent à démontrer le bon fonctionnement de l'essai en répondant de manière adéquate et reproductible à une substance d'essai sensibilisante pour lequel l'ordre de grandeur des effets est bien connu. Il est recommandé d'inclure un TP concurrent puisqu'il démontre la capacité du laboratoire à mener chaque essai correctement, et permet d'évaluer la comparabilité et la reproductibilité intra- et interlaboratoires. Par ailleurs, dans la mesure où certaines autorités réglementaires exigent un TP dans chaque essai, les expérimentateurs sont encouragés à consulter les

▼M3

autorités concernées avant de mener l'ELGL: BrdU-ELISA. De même, le recours systématique à un TP concurrent est recommandé pour éviter d'avoir à réaliser des essais supplémentaires sur animaux, ce qui est parfois exigé lorsqu'un laboratoire se réfère à un TP testé périodiquement (voir paragraphe 12). Le TP doit réagir positivement à l'ELGL: BrdU-ELISA pour un niveau d'exposition supposé accroître l'indice de stimulation supérieur d'au moins 1,6 point par rapport au groupe témoin négatif (TN). La dose de TP sera choisie de manière à ne pas entraîner d'irritation cutanée excessive ou de toxicité systémique, l'induction devant être reproductible sans être exagérée (un IS > 14 sera considéré comme excessif, par exemple). Les TP utilisés en priorité sont l'hexyl cinnamaldéhyde à 25 % (N° CAS 101-86-0) et l'eugénol à 25 % (N° CAS 97-53-0) dans un mélange acétone/huile d'olive (4:1, v/v). Dans certains cas, d'autres témoins positifs répondant aux critères susmentionnés pourront être employés, à condition que ce choix soit correctement justifié.

12. Si l'inclusion d'un groupe TP concurrent demeure recommandée, des essais périodiques (à intervalles ≤ 6 mois) du TP peuvent dans certains cas convenir pour les laboratoires menant régulièrement (c'est-à-dire au moins une fois par mois) des ELGL: BrdU-ELISA et disposant d'une base de données de référence montrant que le laboratoire est apte à obtenir des résultats précis et reproductibles avec les TP. La capacité d'un laboratoire à mener l'ELGL: BrdU-ELISA est efficacement démontrée quand le TP déclenche des résultats positifs cohérents à l'issue d'un minimum de 10 essais indépendants étalés sur une période raisonnable (c'est-à-dire inférieure à un an).

13. Il convient d'inclure un groupe TP concurrent à chaque fois que le protocole de l'ELGL: BrdU-ELISA est modifié (par exemple si des modifications interviennent au niveau du personnel qualifié, des composés et/ou des réactifs utilisés pour la méthode d'essai, de l'équipement mis à contribution, ou de la source d'animaux d'expérience), et ces changements seront documentés dans les rapports de laboratoire. Il faudra tenir compte de l'impact de ces changements sur la validité des données de la base historique pour décider de l'opportunité d'établir une autre base de données afin d'évaluer la cohérence des nouveaux résultats relatives au TP.

14. Les investigateurs gardent à l'esprit que tester le TP périodiquement plutôt que systématiquement comme concurrent pèse sur la précision et l'acceptabilité des résultats négatifs obtenus à l'issue d'un essai sans TP concurrent réalisé dans l'intervalle entre chaque essai périodique du TP. Par exemple, si un essai périodique du TP donne un faux négatif, l'ensemble des résultats négatifs obtenus depuis le dernier essai de TP valable pourront être remis en question. Il faut donc soigneusement considérer les implications de telles retombées avant de décider si les TP seront des concurrents systématiques ou s'ils feront l'objet d'essais périodiques. Par ailleurs, le nombre d'animaux du groupe du TP concurrent sera réduit si cela se justifie du point de vue scientifique et si le laboratoire démontre, en s'appuyant sur ses propres données historiques, que l'on peut utiliser moins de souris (17).

15. Quoique le témoin positif soit testé dans un véhicule produisant un effet constant (par exemple acétone: huile d'olive, 4:1, v/v), certaines situations réglementaires peuvent aussi nécessiter l'essai avec un véhicule moins courant (mélange cliniquement ou chimiquement pertinent) (18). Si le TP concurrent est testé avec un véhicule différent de celui de la substance d'essai, il convient de mettre en place un TV indépendant pour le TP concurrent.

▼**M3**

16. Lorsqu'il s'agit d'évaluer des substances d'essai appartenant à une classe chimique particulière ou donnant des résultats situés dans une certaine fourchette, des substances étalons peuvent s'avérer utiles pour montrer que la méthode d'essai fonctionne correctement et permet de détecter le pouvoir de sensibilisation cutanée de ces types de composés. Les substances étalons adaptées présentent les propriétés suivantes:

— similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie des substances à tester,

— caractéristiques physiques et chimiques connues,

— données obtenues avec l'ELGL: BrdU-ELISA,

— données obtenues avec d'autres modèles animaux et/ou l'être humain.

MODE OPÉRATOIRE

Nombre d'animaux et doses

17. On utilise au moins quatre animaux par groupe de dose, et un minimum de trois concentrations de la substance d'essai, ainsi qu'un groupe TN concurrent ne recevant que le véhicule de cette substance et un TP (concurrent ou récent selon les pratiques du laboratoire, voir paragraphes 11-15). On peut envisager de tester différentes doses de TP, en particulier quand celui-ci ne fait l'objet que d'essais périodiques. Mis à part l'absence de traitement par la substance d'essai, les animaux des groupes témoins sont manipulés et traités de la même manière que les animaux des groupes d'essai.

18. La sélection des doses et du véhicule suit les recommandations données dans les références 2 et 19. Les doses successives sont normalement choisies dans une série de concentrations appropriées telles que 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2.5 %, 1 %, 0,5 %, etc. Le choix de la série utilisée est scientifiquement justifié. Le cas échéant, toutes les informations existantes d'ordre toxicologique (par exemple sur la toxicité aiguë et l'irritation cutanée), structural et physico-chimique sur la substance d'essai en question (et/ou ses analogues de structure) sont prises en compte pour choisir les trois concentrations successives de manière que la plus élevée d'entre elles offre une exposition maximale tout en évitant la toxicité systémique et/ou une irritation cutanée locale excessive (19) (20 et chapitre B.4 de la présente annexe). En l'absence de telles informations, un essai préliminaire peut s'avérer nécessaire (voir paragraphes 21-24).

19. Il convient que le véhicule ne perturbe pas et n'introduise pas un biais dans les résultats du test. Il doit être choisi de manière à optimiser la solubilité pour obtenir la concentration la plus élevée possible dans la préparation d'une solution/suspension adaptée à l'application de la substance d'essai. Les véhicules recommandés sont le mélange acétone/huile d'olive (4:1, v/v), le N,N-diméthylformamide, la méthyléthylcétone, le propylèneglycol et le diméthylsulfoxyde (6) mais d'autres véhicules pourront également être utilisés à condition que ce choix soit suffisamment étayé sur le plan scientifique. Certaines situations réclament un témoin supplémentaire, à savoir un solvant qui se justifie sur le plan clinique ou le mélange dans lequel la substance d'essai est commercialisée. L'expérimentateur veille tout particulièrement à ce que les substances d'essai hydrophiles soient incorporées à un véhicule qui mouille la peau et ne ruisselle pas immédiatement, ce qui peut nécessiter l'ajout de solubilisants appropriés (par exemple Pluronic® L92 à 1 %). Il convient donc d'éviter les véhicules totalement aqueux.

▼M3

20. Le traitement des ganglions lymphatiques de chaque souris permet d'évaluer la variabilité entre individus et de comparer statistiquement les réponses induites par la substance d'essai et par le véhicule témoin (voir paragraphe 33). En outre, il n'est envisageable de réduire le nombre d'animaux du groupe TP qu'en se fondant sur des données individuelles (17). Du reste, certaines autorités réglementaires exigent la collecte de données pour chaque animal. Relever régulièrement les données propres à chaque individu contribue au bien-être des animaux en évitant les essais dupliqués qui seraient nécessaires si les résultats obtenus d'une autre manière (par exemple avec des données par groupe d'animaux) devaient être soumis à des autorités réglementaires ayant d'autres exigences (en particulier la fourniture de données individuelles).

Essai préliminaire

21. En l'absence d'informations permettant d'estimer la concentration d'essai maximale (voir paragraphe 18), il convient d'effectuer un essai préliminaire afin de déterminer le niveau des doses adaptées à l'ELGL: BrdU-ELISA. Cet essai préliminaire aide à quantifier la dose maximale à mettre en œuvre dans l'ELGL: BrdU-ELISA lorsqu'on ne dispose pas d'informations sur la concentration induisant une toxicité systémique (voir paragraphe 24) et/ou une irritation cutanée locale excessive (voir paragraphe 23). Cette concentration maximum de la substance d'essai est de 100 % pour les liquides, ou la plus élevée possible pour les solides et les suspensions.

22. Les conditions de l'essai préliminaire sont les mêmes que celles de l'ELGL: BrdU-ELISA, à ceci près qu'il n'y a pas d'évaluation de la prolifération dans les ganglions lymphatiques et que l'on peut inclure moins d'animaux par groupe de dose. En effet, on suggère d'utiliser seulement un à deux individus par groupe de dose. Il convient d'examiner toutes les souris quotidiennement afin de déceler d'éventuels signes cliniques de toxicité systémique ou d'irritation locale sur le site d'application. Les poids corporels sont consignés préalablement à l'essai et juste avant la fin de l'essai (sixième jour). On examine les deux oreilles de chaque souris pour détecter la présence d'un éventuel érythème, le résultat étant noté conformément à l'échelle figurant dans le tableau 1 (20 et chapitre B.4 de la présente annexe). L'épaisseur de l'oreille est mesurée à l'aide d'une jauge d'épaisseur (par exemple micromètre numérique ou jauge d'épaisseur Peacock Dial) le premier jour (avant toute application), le troisième jour (environ 48 heures après la première dose) et le sixième jour. De plus, au sixième jour, cette épaisseur peut être déterminée à partir du poids d'un échantillon d'oreille, prélevé après l'euthanasie des animaux. Les irritations locales excessives se traduisent par une cotation de l'érythème ≥ 3 et/ou un épaississement de l'oreille d'au moins 25 %, quel que soit le jour de la mesure (21) (22). La dose maximale choisie pour l'étude ELGL: BrdU-ELISA principale sera la dose immédiatement inférieure dans la série de concentrations utilisée pour l'essai préliminaire (voir paragraphe 18) qui n'induit pas une toxicité systémique et/ou une irritation cutanée locale excessive.

Tableau 1

Cotation de l'érythème

Observation	Résultat
Pas d'érythème	0
Érythème très léger (à peine perceptible)	1
Érythème bien défini	2

▼M3

Observation	Résultat
Érythème modéré à grave	3
Érythème grave (rouge violacé) à formation d'escarre empêchant la cotation de l'érythème	4

23. Outre un épaississement de l'oreille de 25 % (21) (22), une augmentation statistiquement significative de l'épaisseur de l'oreille chez les souris traitées par rapport aux individus témoins a également été utilisée pour identifier des produits irritants dans l'ELGL (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Cependant, les augmentations statistiquement significatives inférieures à 25 % ne sont pas systématiquement associées à une irritation excessive (25) (26) (27) (28) (29).

24. Les observations cliniques suivantes peuvent indiquer une toxicité systémique (30) dans le cadre d'une évaluation intégrée, et ainsi permettre d'estimer la dose maximale à utiliser dans l'ELGL: BrdU-ELISA: modifications des fonctions nerveuses (par exemple, piloérection, ataxie, tremblements et convulsions); changements du comportement (par exemple, agressivité, activités de toilettage modifiées, changement marqué d'intensité de l'activité); troubles respiratoires (en termes de fréquence et d'intensité de la respiration, sous forme de dyspnée, halètements ou râles), et modifications de la consommation d'aliments et d'eau. En outre, l'évaluation prendra en compte les éléments suivants: signes de léthargie et/ou absence de réceptivité, et tout signe clinique autre qu'une douleur et un stress légers ou passagers; baisse du poids corporel > 5 % entre le premier et le sixième jour; mortalité. Les animaux moribonds ou montrant des signes de douleur et de stress aigus sont euthanasiés (31).

Programme expérimental de l'étude principale

25. Le programme expérimental se déroule comme suit:

— *Premier jour:* Mesurer et consigner le poids de chaque animal ainsi que toute observation clinique. Appliquer 25 µL d'une dilution adaptée de la substance d'essai, du véhicule seul ou du TP (concurrent ou récent selon les pratiques du laboratoire, voir paragraphes 11-15) au dos de chaque oreille.

— *Deuxième et troisième jours:* Répéter la procédure d'application pratiquée le premier jour.

— *Quatrième jour:* Aucun traitement.

— *Cinquième jour:* Injecter 0,5 mL (5 mg/souris) d'une solution de BrdU (10 mg/mL) par voie intrapéritonéale.

— *Sixième jour:* Noter le poids de chaque animal ainsi que toute observation clinique. Euthanasier les animaux environ 24 heures (24 h) après l'injection de BrdU. Exciser les ganglions lymphatiques auriculaires de drainage de chaque oreille de souris et les placer séparément dans une solution saline tamponnée au phosphate [phosphate buffered saline] (PBS). Les détails et diagrammes relatifs à l'identification et à la dissection des ganglions lymphatiques sont présentés dans la référence (17). Pour approfondir le suivi de la réponse cutanée locale dans l'essai principal, des paramètres supplémentaires comme la cotation de l'érythème auriculaire ou les mesures de l'épaisseur de l'oreille (obtenues à l'aide d'une jauge d'épaisseur ou par pesée d'échantillons d'oreilles après nécropsie) peuvent être inclus dans le protocole d'étude.

▼M3

Préparation des suspensions cellulaires

26. Pour chaque souris, les cellules de ganglions lymphatiques (CGL) excisés bilatéralement sont dispersées par le biais d'une désagrégation mécanique douce à travers un tamis en acier inoxydable à 200 microns, ou de toute autre technique acceptable pour obtenir une suspension unicellulaire (par exemple en broyant les ganglions dans un mortier en plastique jetable avant de les passer dans un tamis en nylon de 70 microns). La procédure de dispersion des CGL constitue une étape cruciale de l'essai, et est maîtrisée préalablement par chaque opérateur. En outre, les ganglions lymphatiques des animaux du groupe TN étant petits, il importe de les manipuler avec précaution afin d'éviter toute perturbation des valeurs IS. Dans chaque cas, le volume de suspension de CGL visé correspond à un volume optimisé préétabli (environ 15 mL). Le volume optimisé est celui pour lequel l'absorbance moyenne du groupe TN se situe entre 0,1 et 0,2.

Détermination de la prolifération cellulaire (quantification de la BrdU dans l'ADN des lymphocytes)

27. La BrdU est quantifié à l'aide d'un kit de dosage ELISA commercial (par exemple Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne, référence 11 647 229 001). Placer rapidement 100 µL de suspension de CGL dans les puits d'une microplaque à fond plat, en triplicats. Après fixation et dénaturation des CGL, ajouter les anticorps anti-BrdU dans chaque puits et laisser réagir. Éliminer ensuite les anticorps anti-BrdU par lavage, puis ajouter la solution de substrat et laisser le chromogène être synthétisé. Mesurer l'absorbance à 370 nm, pour une longueur d'onde de référence fixée à 492 nm. Dans tous les cas, il convient d'optimiser les conditions de l'essai (voir paragraphe 26).

OBSERVATIONS

Observations cliniques

28. Au moins une fois par jour, l'expérimentateur examine attentivement chaque souris afin de déceler d'éventuels signes cliniques, se traduisant par une irritation locale sur le site d'application ou une toxicité systémique. Toutes les observations sont systématiquement consignées pour chaque souris. Les programmes de suivi intègrent les critères permettant d'identifier rapidement les souris montrant des signes de toxicité systémique, d'irritation excessive ou de corrosion locale de la peau, afin qu'elles puissent être euthanasiées (31).

Poids corporels

29. Comme indiqué au paragraphe 25, le poids corporel de chaque animal est mesuré au début de l'essai et au moment programmé pour l'euthanasie.

CALCUL DES RÉSULTATS

30. Les résultats obtenus pour chaque groupe de traitement sont exprimés par un indice de stimulation (IS) moyen. Cet IS s'obtient en divisant l'indice de marquage BrdU moyen de chaque groupe ayant reçu la substance d'essai ou le TP par l'indice de marquage BrdU moyen du groupe témoin traité avec le solvant/TV. L'IS moyen pour les TV est alors égal à 1.

L'indice de marquage BrdU est calculé comme suit:

$$\text{Indice de marquage BrdU} = (\text{ABSem} - \text{ABS blancem}) - (\text{ABSréf} - \text{ABS blancréf})$$

Où em = longueur d'onde d'émission et réf = longueur d'onde de référence.

▼**M3**

31. Un résultat est considéré comme positif lorsque IS ≥ 1,6 (10). Toutefois, l'intensité de la relation dose-effet, la signification statistique et la cohérence des réponses obtenues avec le solvant/véhicule et le TP constituent autant de facteurs pour décider si un résultat limite (c'est-à-dire un IS situé entre 1,6 et 1,9) est jugé positif (3) (6) (32).

32. En cas de réponse positive limite (IS entre 1,6 et 1,9), les expérimentateurs sont invités à examiner des paramètres supplémentaires comme la relation dose-effet, les manifestations de toxicité systémique ou d'irritation excessive, et, le cas échéant, la signification statistique pour définitivement conclure à un résultat positif (10). Diverses propriétés de la substance d'essai sont aussi prises en compte, parmi lesquelles une éventuelle analogie structurelle avec des sensibilisants cutanés connus, le déclenchement d'une irritation cutanée excessive chez la souris, et la nature de la relation dose-effet observée. Ces considérations, ainsi que d'autres, sont examinées en détail dans un autre document (4).

33. Le relevé des données pour chaque souris permet de déterminer statistiquement l'existence et l'intensité d'une relation dose-effet dans les résultats. Tout traitement statistique peut comprendre une évaluation de la relation dose-effet ainsi que des comparaisons des groupes d'essai convenablement adaptées (par exemple, comparaisons par paires des groupes de dose avec le groupe solvant/véhicule témoin concurrent). Les analyses statistiques peuvent notamment inclure une régression linéaire ou le test de William pour étudier la fonction dose-effet, ainsi que le test de Dunnett pour les comparaisons par paires. Pour choisir une méthode appropriée d'analyse statistique, il faut être conscient du risque d'inégalité des variances et d'autres problèmes connexes qui pourraient nécessiter une transformation des données ou une analyse statistique non paramétrique. Quoi qu'il en soit, on peut être amené à calculer les indices de stimulation et effectuer les traitements statistiques avec ou sans certains points de données (parfois appelés «valeurs aberrantes»).

RÉSULTATS ET RAPPORTS

Résultats

34. Les résultats sont récapitulés sous forme de tableau présentant les indices de marquage BrdU pour chaque animal, la moyenne des indices de marquage BrdU/animal pour chaque groupe, la marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) et l'indice de stimulation moyen pour chaque groupe de dose par rapport au groupe solvant/véhicule témoin concurrent.

Rapport d'essai

35. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Substance et mélanges chimique d'essai et substances et mélanges chimiques témoins:

— données d'identification (par exemple numéro CAS et numéro CE, le cas échéant; source; pureté; impuretés connues; numéro de lot),

— état physique et propriétés physico-chimiques (par exemple volatilité, stabilité, solubilité),

— s'il s'agit d'un mélange: composition et pourcentages relatifs des constituants.

Solvant/véhicule:

— données d'identification (pureté; concentration, s'il y a lieu; volume utilisé),

— justification du choix du véhicule.

▼**M3**

Animaux d'essai:

— source des souris CBA,

— état microbiologique des animaux, s'il est connu,

— nombre et âge des animaux,

— source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.

Conditions d'essai:

— source, numéro de lot et données du fabricant en matière d'assurance et de contrôle qualité (sensibilité et spécificité des anticorps, limites de détection) pour le kit ELISA,

— détails concernant la préparation et l'application de la substance d'essai,

— justification du choix des doses (y compris résultats de l'essai préliminaire, le cas échéant),

— concentrations utilisées pour le véhicule et la substance d'essai, et quantité totale de substance d'essai appliquée,

— détails concernant la nourriture et la qualité de l'eau (y compris type et source de nourriture et provenance de l'eau),

— détails concernant le programme de traitement et d'échantillonnage,

— méthodes de détermination de la toxicité,

— critères de décision concernant les études positives ou négatives,

— détails concernant tout écart par rapport au protocole et explication de la manière dont l'écart modifie la conception de l'essai et ses résultats.

Vérification de la fiabilité:

— résumé des résultats du dernier test de fiabilité, notamment informations sur la substance d'essai, sa concentration et le véhicule utilisé,

— résultats des témoins spécifiques au laboratoire pour le TP concurrent et/ou historique ainsi que pour le TN concurrent (solvant/véhicule),

— en l'absence d'un TP concurrent, date et rapport de laboratoire du dernier essai périodique du TP, et rapport détaillant les résultats historiques du TP spécifiques au laboratoire de manière à justifier pourquoi aucun TP concurrent n'a été mis en œuvre.

Résultats:

— poids corporel de chaque souris au lancement du traitement et au moment programmé pour l'euthanasie; moyenne et marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) pour chaque groupe de dose,

— moment du déclenchement des effets et signes de toxicité, y compris l'irritation cutanée sur le site d'administration, pour chaque animal,

— tableau des indices de marquage BrdU et IS par souris pour chaque groupe de traitement,

— moyenne et marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) des indices de marquage BrdU par souris pour chaque groupe de dose, et résultats de l'analyse des valeurs aberrantes au sein de chacun d'eux,

▼M3

— indices de stimulation obtenus, et détermination appropriée de la variabilité prenant en compte les variations entre animaux à la fois dans les groupes ayant reçu la substance d'essai et dans les groupes témoins,

— relation dose-effet,

— analyses statistiques, s'il y a lieu.

Discussion des résultats:

— bref commentaire sur les résultats, analyse de la relation dose-effet et analyses statistiques, s'il y a lieu, et conclusion quant au fait de savoir si la substance d'essai doit être considérée comme un sensibilisant cutané.

BIBLIOGRAPHIE

1. OCDE (2010), Sensibilisation cutanée: essai des ganglions lymphatiques locaux, Ligne directrice n° 429, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

2. Chamberlain, M. et Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol*., 34, 999-1002.

3. Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. et Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 34, 985-997.

4. Basketter, D.A., Gerberick, G.F. et Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 36, 327-33.

5. Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. et Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol*., 146, 49-59.

6. ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM), NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

7. Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Biochem. Pharmacol., 34, 3-258.*

8. Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 274-286.

9. Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 249- 257.

10. ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA), NIH Publication No. 10-7552A/B, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna- ELISA/TMER.htm]

▼**M3**

11. ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf]

12. Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. et Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay, *j. Appl. Toxicol.*, 25, 129-134.

13. OCDE (1992), *Sensibilisation de la peau*, Ligne directrice n° 406, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

14. Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. et Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitizing potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), *Food Chem. Toxicol*., 46, 1896-1904.

15. Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. et Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, *Reg. Toxicol.Pharmacol*., 55, 90-96.

16. ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

17. ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

18. McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, *Toxicol.*, 238, 71-89.

19. Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. et Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol.*, 93, 13-31.

20. OCDE (2002), *Effet irritant/corrosif aigu sur la peau*, Ligne directrice n° 404, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

21. Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. et DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, *Toxicologis*t, 96 (S-1), 235.

22. ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

23. Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. et Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, *Drug Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.

24. Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. et Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.

25. Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. et Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

▼**M3**

26. Hayes, B.B. et Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.

27. Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. et Vohr, H.W. (2005), A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round, *Toxicol.*, 212, 60-68.

28. Vohr, H.W. et Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.

29. Patterson, R.M., Noga, E. et Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

30. ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

31. OCDE (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Série sur les essais et évaluations n° 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

32. Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. et Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ.l Health*, 53, 563-79.

33. OCDE (2005), *Guidance Document on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Série sur les essais et évaluations No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

▼**M3**

Appendice 1

DÉFINITIONS

Assurance qualité: procédé de gestion dans lequel le respect des normes d'essai, des obligations du laboratoire et des procédures d'enregistrement des données, ainsi que la précision du transfert des données, sont évalués par des personnes indépendantes de celles qui réalisent les essais.

Faux négatif: substance d'essai identifiée à tort comme négative ou inactive à l'issue de l'essai, alors qu'elle est en fait positive ou active (33).

Faux positif: substance d'essai identifiée à tort comme positive ou active à l'issue de l'essai, alors qu'elle est en fait négative ou inactive (33).

Fiabilité: mesure dans laquelle la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intralaboratoire et interlaboratoires (33).

Indice de stimulation (IS): paramètre d'évaluation du pouvoir de sensibilisation cutanée d'une substance d'essai, calculé comme le quotient de la prolifération mesurée dans les groupes traités sur celle du groupe témoin concurrent recevant le véhicule.

Précision: degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa pertinence. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de «concordance» pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (33).

Reproductibilité interlaboratoires: mesure du degré auquel différents laboratoires qualifiés qui emploient le même protocole et testent les mêmes substances d'essai peuvent produire des résultats similaires en termes de qualité et de quantité. La reproductibilité interlaboratoires est déterminée au cours des processus de prévalidation et de validation, et indique dans quelle mesure un essai peut être transféré sans problème entre laboratoires. On parle aussi de reproductibilité entre laboratoires (33).

Reproductibilité intralaboratoire: détermination du degré auquel divers membres du personnel qualifié d'un même laboratoire réussissent à obtenir des résultats identiques en ayant recours à un protocole spécifique à des moments différents. On parle aussi de reproductibilité au sein du laboratoire (33).

Risque: éventualité d'un effet indésirable sur la santé ou l'environnement. L'effet indésirable se manifeste uniquement lorsque le niveau d'exposition est suffisant.

Sensibilisation cutanée: processus immunologique résultant de l'exposition topique d'un sujet sensible à un allergène chimique, et qui se traduit par une réaction immunologique cutanée pouvant entraîner le développement d'une sensibilisation de contact.

Substance d'essai (également dénommée substance chimique d'essai): toute substance et tout mélange testés selon la présente méthode d'essai.

Substance étalon: substance sensibilisante ou non sensibilisante utilisée comme référence pour comparer les effets d'une substance d'essai. Une substance étalon présente les propriétés suivantes: i) source(s) régulières et fiables; ii) similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie des substances à tester; iii) caractéristiques physiques et chimiques connues; iv) données confirmant les effets connus; et v) puissance connue dans l'intervalle de la réponse désirée.

Valeur aberrante: une valeur aberrante est une valeur observée qui diffère nettement des autres valeurs dans un échantillon aléatoire d'une population.

▼M4

B.52. TOXICITÉ AIGUË PAR INHALATION – MÉTHODE PAR CLASSE DE TOXICITÉ AIGUË

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 436 (2009) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Une première ligne directrice pour les essais de toxicité aiguë par inhalation (403) avait été adoptée en 1981 et a été révisée depuis [voir chapitre B.2 de la présente annexe (1)]. À la suite de l'adoption, en 2001, de la méthode par classe de toxicité aiguë par voie orale [chapitre B.1 *ter* de la présente annexe (5)], il est apparu approprié de développer une méthode par classe de toxicité aiguë par inhalation (2) (3) (4). Une évaluation rétrospective des performances de la méthode d'essai par classe de toxicité aiguë pour la toxicité aiguë par inhalation a montré que cette méthode était utilisable à des fins de classification et d'étiquetage (6). La méthode d'essai pour les essais de toxicité par inhalation faisant appel à la méthode par classe de toxicité aiguë permettra l'utilisation d'étapes successives de concentrations cibles fixées pour déterminer la classe de toxicité de la substance d'essai. Bien que la létalité soit le principal effet mesuré, les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance ou de détresse sévère sont euthanasiés afin de minimiser leur souffrance. Des précisions concernant les effets mesurés éthiquement acceptables sont disponibles dans le document d'orientation n° 19 de l'OCDE (7).

2. On trouvera dans le document d'orientation n° 39 sur les essais de toxicité aiguë par inhalation des indications pour la conduite et l'interprétation de la présente méthode d'essai (8).

3. Les définitions utilisées dans la présente méthode d'essai figurent à l'appendice 1 et dans le document d'orientation n° 39 (8).

4. Cette méthode d'essai fournit des informations qui permettent à la fois l'évaluation des dangers et le classement de la substance d'essai conformément au règlement (CE) n° 1272/2008 relatif à la classification pour les substances présentant une toxicité aiguë (9). Si des estimations ponctuelles des valeurs de la CL_{50} ou des analyses de la courbe concentration- réponse sont nécessaires, il convient de se reporter au chapitre B.2 de la présente annexe (1). Pour plus d'informations sur le choix des méthodes d'essai, il convient de se reporter au document d'orientation n° 39 (8). La présente méthode d'essai n'est pas spécifiquement destinée à tester des articles spéciaux comme les substances isométriques ou fibreuses faiblement solubles ou les nanomatériaux manufacturés.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

5. Avant d'entreprendre un essai conformément à la présente méthode d'essai, le laboratoire d'essai devra prendre en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai, y compris les études existantes dont les résultats éviteraient des essais supplémentaires, afin de recourir le moins possible aux animaux. Parmi les informations utiles pour la détermination de l'espèce, de la souche, du sexe, du mode d'exposition et des concentrations d'essai appropriés, citons: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les résultats de tous les essais de toxicité in vitro ou in vivo auxquels elle a été soumise; son (ses) utilisation(s) escomptée(s) et les risques d'exposition humaine; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques sur les substances structurellement apparentées. Les concentrations susceptibles d'engendrer une souffrance ou une détresse sévères, du fait de propriétés corrosives [1] ou fortement irritantes, ne sont pas testées à l'aide de cette méthode d'essai, voir document d'orientation 39 (8).

[1] L'évaluation de la corrosivité peut reposer sur un avis d'expert basé sur les éléments suivants: données expérimentales sur l'homme et l'animal, données (in vitro) existantes [voir, par exemple, le chapitre B.40 (11) de la présente annexe ou la ligne directrice 435 de l'OCDE (12), valeurs du pH, informations concernant des substances analogues ou toute autre donnée pertinente].

▼M4

PRINCIPE DE L'ESSAI

6. Le principe de cet essai est d'obtenir, avec un processus séquentiel, des informations suffisantes sur la toxicité aiguë par inhalation de la substance d'essai, pour parvenir à son classement avec une exposition de 4 heures. Des objectifs règlementaires spécifiques peuvent nécessiter de recourir à d'autres durées d'exposition. Les essais pour chacun des niveaux de concentration définis porteront sur 3 animaux de chaque sexe. En fonction de la mortalité et/ou de l'état moribond des animaux, 2 étapes peuvent suffire pour permettre de juger de la toxicité aiguë de la substance d'essai. S'il est prouvé que l'un des sexes est plus sensible à la substance d'essai, l'essai peut se poursuivre avec seulement les animaux de ce sexe. Le résultat de l'étape précédente détermine l'étape suivante, c'est-à-dire:

a) l'arrêt de l'essai;

b) un essai sur trois animaux par sexe; ou

c) un essai sur 6 animaux, tous du sexe le plus sensible à la substance d'essai, la limite inférieure de la classe de toxicité devant être déterminée à partir d'essais portant sur 6 animaux par groupe de concentration d'essai, indépendamment du sexe.

7. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés, et sont pris en compte dans l'interprétation des résultats de l'essai au même titre que ceux qui succombent au cours de l'essai. Le document d'orientation de l'OCDE n° 19 sur les effets mesurés éthiquement acceptables détaille les critères orientant la décision d'euthanasier les animaux moribonds ou en grande souffrance, et aide à reconnaître une mort prévisible ou imminente (7).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Choix des espèces animales

8. Le choix s'orientera vers de jeunes rongeurs en bonne santé, de souches communément utilisées en laboratoire. Le rat étant l'espèce la plus utilisée, il faudra justifier l'emploi d'autres espèces.

Préparation des animaux

9. Les femelles sont nullipares et non gravides. Le jour de leur exposition, les animaux sélectionnés sont de jeunes adultes âgés de 8 à 12 semaines. Leur poids corporel ne devra pas excéder, pour chaque sexe, ± 20 % du poids moyen des animaux du même âge précédemment exposés. Sélectionnés au hasard, les animaux sont marqués pour être identifiés individuellement. En vue de leur acclimatation aux conditions de laboratoire, ils seront conservés dans leur cage pour une période d'au minimum 5 jours avant le début de l'essai. Les animaux sont également acclimatés aux appareils d'essai, pendant une courte période précédant l'essai, afin d'atténuer le stress causé par leur introduction dans un nouvel environnement.

Conditions d'élevage des animaux

10. La température du local expérimental où les animaux sont conservés est de 22 ± 3 °C. Le taux d'humidité relative est idéalement maintenu entre 30 et 70 %, encore qu'il ne soit pas toujours possible de le faire si l'eau est utilisée comme véhicule. Avant et après exposition, les animaux sont généralement mis en cage en groupes par sexe et par concentration, mais le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal, et ne doit engendrer qu'un minimum de pertes dues au cannibalisme et aux combats. Si les animaux sont exposés

▼M4

«nez seul», il peut être nécessaire de les acclimater aux tubes de contention. Ceux-ci ne doivent pas provoquer chez les animaux de stress excessif, qu'il soit de nature physique, thermique ou dû à leur immobilisation. Les contraintes qu'ils subissent peuvent en effet modifier les paramètres physiologiques mesurés de l'animal, comme sa température corporelle (hyperthermie) et/ou son volume respiratoire par minute. Si l'on dispose de données génériques montrant que de telles modifications ne se produisent pas de façon appréciable, alors la période d'adaptation préalable aux tubes de contention n'est pas nécessaire. Les animaux exposés «corps entier» à un aérosol sont enfermés individuellement pendant l'exposition pour empêcher la filtration de l'aérosol par la fourrure de leurs congénères. À l'exception des périodes d'exposition, le régime alimentaire des animaux est le régime classique et certifié de laboratoire, avec eau potable à satiété. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité.

Chambres d'inhalation

11. Le choix de la chambre d'inhalation prend en compte la nature de la substance d'essai et l'objet de l'essai. Le mode d'exposition «nez seul» (qui inclut les dispositifs «tête seule», «nez seul» et «museau seul») est privilégié. Le mode d'exposition «nez seul» est généralement choisi pour les études d'aérosols liquides ou solides et pour les vapeurs susceptibles de se condenser en aérosols. L'utilisation d'un mode d'exposition «corps entier» peut être préférable pour les besoins spécifiques de l'étude, mais elle est justifiée dans le rapport de l'étude. Pour assurer la stabilité de l'atmosphère d'une chambre d'exposition «corps entier», on veillera à ce que le «volume» total des animaux d'expérience ne dépasse pas 5 % du volume de la chambre. Le document d'orientation 39 (8) décrit les principes des techniques d'exposition «corps entier» ou «nez seul», ainsi que leurs avantages et inconvénients spécifiques

CONDITIONS D'EXPOSITION

Administration des concentrations

12. Il est recommandé une durée fixe d'exposition de quatre heures, sans compter le temps d'équilibration. D'autres durées d'exposition sont possibles pour répondre à des besoins spécifiques, cependant une justification devra être apportée dans le rapport d'étude, voir document d'orientation 39 (8). Les animaux exposés «corps entier» demeurent seuls dans la chambre afin d'éviter l'ingestion de la substance d'essai par le toilettage de leurs compagnons. Les animaux sont privés de nourriture pendant la période d'exposition. Dans une exposition «corps entier», les animaux peuvent boire de l'eau.

13. Les animaux sont exposés à la substance d'essai présentée sous forme de gaz, de vapeur, d'aérosol ou sous une forme mixte. L'état physique à tester dépend des propriétés physico-chimiques de la substance, de la concentration choisie, et/ou de la forme physique sous laquelle il est le plus probable qu'elle se présente lors de sa manipulation et de son utilisation. Les substances d'essai chimiquement réactives ou hygroscopiques sont testées sous air sec. On prendra soin d'éviter les concentrations susceptibles de provoquer une explosion.

Répartition granulométrique

14. Une mesure de la taille des particules est réalisée pour tous les aérosols et les vapeurs susceptibles de se condenser pour former des aérosols. Pour que toutes les régions pertinentes de l'appareil respiratoire soient exposées, il est recommandé d'utiliser des aérosols dont le diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) se situe entre 1 et 4 μm, avec un écart type géométrique (σ_g) compris entre 1,5 et 3,0 (8) (13) (14). Un effort raisonnable est fourni pour remplir ces conditions, mais si tel n'est pas le cas, un jugement d'expert est nécessaire. Par exemple, les particules des fumées métalliques peuvent avoir une taille inférieure à cette norme, tandis que les particules chargées, les fibres et les substances hygroscopiques (dont la taille augmente dans l'environnement humide du tractus respiratoire) peuvent avoir une taille supérieure.

▼M4

Préparation de la substance d'essai dans un véhicule

15. Pour atteindre la concentration et la taille granulométrique appropriées de la substance d'essai, il est possible d'avoir recours à un véhicule; en règle générale l'eau est choisie de préférence. Les substances particulaires peuvent être soumises à des procédés mécaniques afin d'atteindre la répartition granulométrique requise, mais un soin particulier devra être pris de ne pas décomposer ou altérer la substance d'essai. Lorsque les procédés mécaniques sont suspectés d'avoir altéré la composition de la substance d'essai (température extrême due aux frictions d'un broyage excessif, par exemple), la composition de la substance d'essai devra être vérifiée analytiquement. On prendra soin de ne pas contaminer la substance d'essai. Il n'est pas nécessaire de tester les substances granulaires non friables qui sont élaborées précisément pour ne pas être inhalables. Un test d'usure de surface est réalisé pour démontrer que la manipulation de la substance granulaire ne produit pas de particules respirables. Dans le cas contraire, un essai de toxicité par inhalation est réalisé.

Animaux témoins

16. Un groupe témoin négatif (air) n'est pas nécessaire. Lorsqu'un véhicule autre que l'eau est utilisé pour produire l'atmosphère d'essai, un groupe témoin du véhicule est utilisé seulement quand on ne dispose pas de données historiques sur la toxicité. Si aucune toxicité n'a été détectée lors de l'étude de la substance d'essai préparée dans un véhicule, celui-ci est considéré comme non toxique à la concentration testée; il n'y a donc pas lieu d'utiliser de témoin du véhicule.

CONTRÔLE DES CONDITIONS D'EXPOSITION

Débit d'air dans la chambre d'exposition

17. Le débit d'air dans la chambre est contrôlé avec soin, suivi en continu et enregistré au moins toutes les heures pendant chaque exposition. Le suivi de la concentration de l'atmosphère d'essai (ou stabilité temporelle) constitue une mesure complète de tous les paramètres dynamiques et fournit un moyen indirect de contrôler tous les paramètres dynamiques pertinents de la production de l'atmosphère d'essai. On prendra particulièrement soin d'éviter toute re-respiration dans les chambres d'exposition «nez seul» lorsque le débit d'air à travers le système d'exposition ne permet pas de produire une circulation dynamique de l'atmosphère contenant la substance d'essai. Des méthodologies sont prévues pour démontrer l'absence de re-respiration dans les conditions expérimentales choisies (8) (15). La concentration d'oxygène est d'au moins 19 % et celle de dioxyde de carbone ne dépasse pas 1 %. Si ces conditions ne peuvent être respectées, les concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone sont mesurées.

Température et humidité relative de la chambre d'exposition

18. La température de la chambre d'exposition est maintenue à 22 ± 3 °C. Dans les cas d'exposition «nez seul» et «corps entier» l'humidité relative dans la zone où respire l'animal est suivie et enregistrée trois fois au minimum pour les durées allant jusqu'à 4 heures, et toutes les heures pour les durées plus courtes. Le taux d'humidité relative est idéalement compris entre 30 et 70 %. Il est possible que ce taux ne puisse être atteint (par exemple, dans le cas d'un mélange à base d'eau), ou qu'il ne puisse être mesuré en raison d'interférences de la substance d'essai avec la méthode d'essai.

▼M4

Substance d'essai: concentration nominale

19. Dans la mesure du possible, la concentration nominale dans la chambre d'exposition est calculée et enregistrée. La concentration nominale est la masse de la substance d'essai divisée par le volume d'air total qui passe dans le circuit de la chambre d'inhalation. La concentration nominale ne sert pas à caractériser l'exposition des animaux, mais une comparaison de la concentration nominale avec la concentration réelle donne une indication de la capacité de production du système d'essai, et peut donc permettre de mettre en évidence des problèmes de production.

Substance d'essai: concentration réelle

20. La concentration réelle est la concentration de la substance d'essai dans la zone de la chambre d'inhalation où les animaux respirent. Les concentrations réelles peuvent être obtenues par des méthodes spécifiques (par exemple, échantillonnage direct, méthodes d'adsorption ou de réaction chimique, et caractérisation analytique ultérieure) ou par des méthodes non spécifiques comme la gravimétrie sur filtre. Le recours à l'analyse gravimétrique n'est acceptable que pour des aérosols ne contenant qu'un seul composant en poudre ou pour des aérosols de liquides peu volatils, et des caractérisations spécifiques à la substance d'essai sont également effectuées par une pré-étude appropriée. Il est aussi possible d'avoir recours à la gravimétrie pour déterminer la concentration d'un aérosol contenant plusieurs composants en poudre, mais des données analytiques sont alors nécessaires, afin de démontrer que la composition du produit en suspension dans l'air est analogue à celle du produit de départ. Faute de cette information, il peut s'avérer nécessaire de soumettre la substance d'essai (idéalement en suspension dans l'air) à une nouvelle analyse à intervalles réguliers tout au long de l'étude. Pour des agents aérosolisés susceptibles de s'évaporer ou de se sublimer, il faut démontrer que toutes les phases ont été recueillies selon la méthode choisie. Les concentrations cibles, nominales et réelles sont fournies dans le rapport d'étude, mais seules les concentrations réelles sont utilisées dans les analyses statistiques pour calculer la valeur des concentrations létales.

21. Il est recommandé de n'employer si possible qu'un seul lot de la substance d'essai, et l'échantillon de la substance est conservé dans des conditions préservant sa pureté, son homogénéité et sa stabilité. Avant le début de l'étude, il convient de réaliser une caractérisation de la substance d'essai afin de déterminer sa pureté et, si cela est techniquement possible, son identité et les quantités de contaminants et d'impuretés identifiés. Pour cela, on pourra recueillir les données suivantes: temps de rétention et surface relative du pic, poids moléculaire obtenu par spectroscopie de masse ou chromatographie en phase gazeuse, ou autres estimations. Bien que le laboratoire d'essai ne soit pas responsable de l'identification de la substance d'essai, il peut, par prudence, confirmer au moins une partie des caractéristiques fournies par le donneur d'ordre (couleur, nature physique, etc.).

22. L'atmosphère d'exposition est maintenue aussi constante que possible, et suivie soit en continu, soit par intermittence en fonction de la méthode d'analyse. Lorsque l'injection s'effectue de façon intermittente, les échantillons d'atmosphère de la chambre sont prélevés au moins deux fois sur une étude de quatre heures. En cas d'impossibilité en raison de débits d'air limités ou de faibles concentrations, le recueil d'un échantillon pour toute la période d'exposition est acceptable. Si des fluctuations nettes apparaissent d'un échantillon à un autre, la prochaine concentration d'essai devra utiliser quatre échantillons par exposition. Les écarts entre la concentration dans chaque chambre et la concentration moyenne n'excèdent pas ± 10 % pour les gaz et vapeurs et ± 20 % pour les aérosols liquides ou solides. Il convient de calculer et de noter le temps d'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}). La durée d'une exposition couvre le temps de production de la substance d'essai, y compris le temps nécessaire pour l'égalisation des concentrations dans la chambre d'exposition t_{95}. Des indications pour l'estimation de t_{95} sont fournies dans le document d'orientation 39 (8).

▼M4

23. Pour des mélanges très complexes constitués de gaz ou vapeurs et d'aérosols (atmosphères de combustion ou substances d'essai propulsées à partir de produits/dispositifs spécialisés, par exemple), chaque phase peut se comporter différemment dans la chambre d'inhalation. Pour chacune des phases (gaz ou vapeur et aérosol), on choisira donc au moins une substance indicatrice (analyte), en général le principe actif du mélange. Quand la substance d'essai est un mélange, la concentration analytique devra être indiquée pour le mélange global et pas uniquement pour le principe actif ou le composant (analyte). Pour plus d'informations sur les concentrations réelles, se reporter au document d'orientation 39 (8).

Substance d'essai: répartition granulométrique

24. La répartition granulométrique des aérosols est déterminée au minimum deux fois pour chaque exposition de 4 heures, à l'aide d'un impacteur en cascade ou d'un autre instrument, comme un spectromètre de mesure de la taille des particules aérodynamiques. Si les résultats obtenus avec l'impacteur en cascade ou un autre instrument se révèlent équivalents, ce dernier peut être utilisé tout au long de l'étude. Pour confirmer la capacité de recueil des particules de l'outil principal, un second instrument devra être utilisé en parallèle, par exemple un filtre gravimétrique ou un barboteur à gaz/impacteur. La concentration massique obtenue par l'analyse granulométrique se rapproche, dans des limites raisonnables, de celle obtenue par l'analyse sur filtre, voir document d'orientation 39 (8). Si cette équivalence est établie au début de la phase d'étude, il n'est pas nécessaire d'effectuer des mesures de confirmation dans la suite de l'étude. Pour le bien-être des animaux, il convient de réduire au minimum les données douteuses qui nécessiteraient de répéter une exposition. Une répartition granulométrique est effectuée dans le cas des vapeurs, s'il est possible qu'une condensation de la vapeur conduise à la formation d'un aérosol, ou si des particules sont détectées dans une atmosphère de vapeur susceptible de présenter des phases mixtes (voir paragraphe 14).

MODE OPÉRATOIRE

Essai principal

25. Pour chaque étape, trois animaux de chaque sexe, ou six animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, seront utilisés. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées «nez seul», il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Le niveau de concentration à utiliser comme dose initiale est choisi parmi les quatre niveaux fixés; le niveau de concentration initiale est celui le plus susceptible de présenter une toxicité pour certains des animaux traités. Les schémas d'essai pour les gaz, les vapeurs et les aérosols (présentés dans les appendices 2 à 4) correspondent aux essais effectués aux valeurs limites des catégories 1 à 4 du règlement relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage (9), pour les gaz (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4 h) (appendice 2), pour les vapeurs (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4 h) (appendice 3) et pour les aérosols (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4 h) (appendice 4). La catégorie 5, que ne prévoit pas le règlement (CE) n° 1272/2008 (9), se rapporte à des concentrations dépassant les concentrations limites respectives. Chacune des concentrations de départ possède son propre schéma d'essai. En fonction du nombre d'animaux morts ou euthanasiés, le mode opératoire d'essai suit les flèches indiquées jusqu'à ce qu'une catégorisation puisse être établie.

26. L'intervalle de temps entre l'exposition des différents groupes est déterminé par le moment d'apparition, la durée et la gravité des signes de toxicité observés. L'exposition des animaux au niveau de concentration supérieur est retardée jusqu'à ce que l'on soit raisonnablement sûr que les animaux précédemment soumis au traitement ont survécu. Il est recommandé d'espacer de trois à quatre jours les expositions à chaque niveau de concentration afin de permettre l'observation d'une toxicité retardée. L'intervalle de temps peut être ajusté, par exemple en cas de réponses peu concluantes.

▼M4

Essai limite

27. L'essai limite est utilisé si l'on sait ou si l'on prévoit que la substance d'essai sera virtuellement non toxique, c'est-à-dire qu'elle ne suscitera une réponse de toxicité qu'au-delà de la concentration limite réglementaire. Des informations sur la toxicité de la substance d'essai peuvent être tirées d'essais déjà pratiqués sur des substances ou mélanges analogues, en tenant compte de l'identité et du pourcentage des composants dont la toxicité est avérée. Si l'on manque d'informations sur la toxicité de la substance d'essai, ou si l'on s'attend à ce qu'elle soit toxique, l'essai principal est réalisé; le document d'orientation 39 fournit de plus amples informations à ce sujet (8).

28. Selon le mode opératoire normal, trois animaux par sexe, ou six animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont exposés à des concentrations de 20 000 ppm pour les gaz, 20 mg/l pour les vapeurs et 5 mg/l pour les poussières/brouillards. Si elles sont atteintes, ces concentrations servent de limite d'essai pour la présente méthode d'essai. Pour les essais d'aérosols, le principal objectif est d'atteindre une taille de particule qui soit respirable (c'est-à-dire un DAMM de 1 à 4 μm), ce qui est possible avec la plupart des substances d'essai à des concentrations de 2 mg/l. Les essais sur des aérosols à des concentrations supérieures à 2 mg/l ne sont tentés que si l'on peut obtenir des particules de taille respirable, voir document d'orientation 39 (8). Selon le SGH (16), il est déconseillé de réaliser des essais au-delà des concentrations limites, pour des raisons de bien-être des animaux. Les essais en catégorie 5 du SGH (16), non prévue par le règlement (CE) n° 1272/2008 (9), ne sont envisagés que s'il est très probable que leurs résultats présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé humaine, et une justification est alors fournie dans le rapport d'essai. En cas de substance potentiellement explosive, on prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de provoquer une explosion. Afin d'éviter le recours inutile à des animaux, un essai sans animaux est effectué avant l'essai limite pour s'assurer qu'il est possible d'atteindre dans la chambre les conditions expérimentales d'un essai limite.

OBSERVATIONS

29. Un examen clinique des animaux est pratiqué régulièrement pendant la période d'exposition. Après l'exposition, des examens cliniques sont réalisés au minimum deux fois le jour de l'exposition, ou plus fréquemment suivant la réponse des animaux au traitement, et au minimum une fois par jour par la suite pendant une période de 14 jours. La durée de la période d'observation n'est pas fixée, mais est déterminée par la nature et le moment d'apparition des signes cliniques, ainsi que par la durée de la période de récupération. Les moments d'apparition et de disparition des signes de toxicité sont importants, en particulier lorsque les signes de toxicité ont tendance à être retardés. Toutes les observations sont systématiquement enregistrées individuellement pour chaque animal. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés pour des raisons de bien-être animal. Lors de l'examen clinique des signes de toxicité, il convient de veiller à ne pas confondre une piètre apparence initiale et des troubles respiratoires passagers, imputables à la procédure d'exposition, avec les effets liés au traitement. Les principes et critères résumés dans le document d'orientation sur les effets mesurés éthiquement acceptables sont pris en considération (7). Quand des animaux sont retrouvés morts ou sont euthanasiés, l'heure de la mort est consignée le plus précisément possible.

▼M4

30. Les observations quotidiennes portent notamment sur les modifications de la peau et des poils, des yeux et des muqueuses, mais aussi sur les changements affectant l'appareil respiratoire, le système circulatoire, les systèmes nerveux autonome et central, ainsi que l'activité somatomotrice et le comportement. Toute différentiation entre les effets locaux et systémiques est consignée autant que possible. Les tremblements, les convulsions, la salivation, les diarrhées, la léthargie, le sommeil et le coma doivent retenir l'attention. La mesure de la température rectale peut aider à mettre en évidence une bradypnée réflexe ou une hypo/hyperthermie liée au traitement ou au confinement.

Poids corporel

31. Le poids corporel de chacun des animaux est enregistré une fois lors de la période d'acclimatation, le jour de l'exposition (jour 0) juste avant celle-ci, et au moins les jours 1, 3 et 7 (puis de façon hebdomadaire par la suite) ainsi qu'au moment de la mort ou de l'euthanasie, s'il est postérieur au jour 1. Le poids corporel est un indicateur critique reconnu de la toxicité, on surveillera donc attentivement les animaux, dont le poids reste constamment inférieur de 20 % ou plus à celui précédant l'étude. Les animaux survivants sont pesés et euthanasiés à la fin de la période postexposition.

Pathologie

32. Tous les animaux d'expérience, y compris ceux morts au cours de l'essai ou euthanasiés et écartés de l'étude pour des raisons de bien-être animal, subissent une autopsie macroscopique. Lorsqu'un animal est découvert mort et que son autopsie n'est pas réalisable immédiatement, l'animal est réfrigéré (mais non congelé) à une température suffisamment basse pour minimiser l'autolyse. Les autopsies sont réalisées le plus tôt possible, en général dans un délai d'un à deux jours. Tous les changements macropathologiques sont enregistrés pour chaque animal en prêtant particulièrement attention aux voies respiratoires.

33. D'autres observations, ajoutées a priori à dessein, peuvent être envisagées afin d'élargir l'interprétation de l'étude, comme la mesure du poids pulmonaire des rats survivants et/ou la mise en évidence d'une irritation par examen de l'appareil respiratoire au microscope. Les organes examinés peuvent être ceux pour lesquels une réaction au traitement est connue ou attendue et ceux montrant une pathologie macroscopique chez les animaux survivant au moins 24 heures. Un examen microscopique de l'intégralité de l'appareil respiratoire peut fournir des informations utiles pour les substances d'essai réactives à l'eau, comme les acides et les substances hygroscopiques.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

34. Pour chacun des animaux, le poids corporel et les conclusions de l'autopsie sont fournis. Les résultats des observations cliniques sont résumés sous la forme de tableaux et indiquer pour chaque groupe d'essai: le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes spécifiques de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, l'heure de la mort de chacun des animaux, la description et l'évolution dans le temps des effets toxiques ainsi que leur réversibilité, et les conclusions de l'autopsie.

▼M4

Rapport d'essai

35. Le rapport d'essai contient, s'il y a lieu, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience et conditions d'élevage:

— description des conditions d'encagement, y compris: nombre (ou évolution du nombre) d'animaux par cage, matériel de litière, température ambiante et taux d'humidité relative, photopériode et identification du régime alimentaire,

— espèces/souches utilisées et justification éventuelle de l'utilisation d'une espèce autre que le rat,

— nombre, âge et sexe des animaux,

— méthode de randomisation,

— détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (notamment origine/type de régime alimentaire, origine de l'eau),

— description d'un éventuel conditionnement préalable à l'essai, tel que régime alimentaire, quarantaine ou traitement de maladie.

Substance d'essai:

— nature physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (y compris isomérisation),

— données d'identification et numéro CAS (Chemical Abstract Services) s'il est connu.

Véhicule:

— justification de l'emploi d'un véhicule et justification de son choix (s'il ne s'agit pas de l'eau),

— données historiques ou concordantes démontrant que le véhicule n'interfère pas avec les résultats de l'étude.

Chambre d'inhalation:

— description de la chambre d'inhalation avec ses dimensions et son volume,

— source et description de l'équipement utilisé pour l'exposition des animaux et pour la production de l'atmosphère,

— équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité, la granulométrie et la concentration réelle,

— source d'air, traitement de l'air fourni/évacué et système de climatisation utilisé,

— méthodes utilisées pour étalonner l'équipement afin d'assurer l'homogénéité de l'atmosphère d'essai,

— différence de pression (positive ou négative),

— orifices d'exposition par chambre («nez seul») ou emplacement des animaux dans le système («corps entier»),

— homogénéité/stabilité temporelle de l'atmosphère d'essai,

— situation des capteurs thermiques et hygrométriques et échantillonnage de l'atmosphère d'essai dans la chambre d'exposition,

— débits d'air, débit d'air/orifice d'exposition («nez seul») ou rapport du volume de l'animal à la chambre («corps entier»),

— informations sur l'équipement utilisé, le cas échéant, pour mesurer l'oxygène et le dioxyde de carbone,

▼**M4**

— temps nécessaire pour atteindre l'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}),

— nombre de changements de volume par heure,

— doseurs (s'il y en a).

Données concernant l'exposition:

— justification du choix de la concentration cible dans l'étude principale,

— concentrations nominales (masse totale de substance d'essai produite dans la chambre d'inhalation, divisée par le volume d'air traversant la chambre),

— concentrations réelles de la substance d'essai obtenues dans la zone où respirent les animaux; pour les mélanges à tester produisant des formes physiques hétérogènes (gaz, vapeurs, aérosols), chacun des constituants peut être analysé séparément,

— toutes les concentrations atmosphériques sont rapportées en unités de masse (mg/l, mg/m^3, etc.); les unités de volume (ppm, ppb) peuvent aussi être indiquées entre parenthèses,

— répartition granulométrique des particules, diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) et écart type géométrique (σ_g), ainsi que leur méthode de calcul. Les autres analyses de la taille de particules sont consignées.

Conditions expérimentales

— détails sur la préparation de la substance d'essai, y compris sur les procédures utilisées pour réduire la taille des particules des substances solides ou pour préparer les solutions de la substance d'essai. Lorsque des procédés mécaniques sont susceptibles d'avoir altéré la composition de la substance d'essai, inclure les résultats des analyses effectuées pour vérifier la composition de la substance d'essai,

— description (si possible avec schéma) de l'équipement utilisé pour produire l'atmosphère d'essai et pour exposer les animaux à celle-ci,

— détails sur la méthode de chimie analytique utilisée et la méthode de validation (notamment rendement de récupération de la substance d'essai à partir du milieu d'échantillonnage),

— justification du choix des concentrations d'essai.

Résultats:

— tableau présentant la température, le taux d'humidité et le débit d'air dans la chambre d'inhalation,

— tableau de données sur les concentrations nominales et réelles dans la chambre d'inhalation,

— tableau de données sur la taille des particules, notamment données analytiques sur le prélèvement d'échantillons, la répartition granulométrique et les calculs du DAMM et de σ_g,

— tableau de données sur les réponses et le niveau de concentration pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris de mortalité, et nature, sévérité et durée des effets),

— poids corporel de chacun des animaux enregistrés lors de l'essai, date et heure de leur mort si celle-ci intervient avant l'euthanasie prévue; moment d'apparition et évolution des signes de toxicité et, le cas échéant, leur réversibilité,

▼**M4**

— pour chaque animal, résultats de l'autopsie et observations histopathologiques disponibles,

— classement dans les catégories du règlement (CE) n° 1272/2008 et valeur limite de la CL_{50}.

Discussion et interprétation des résultats:

— un effort particulier est consacré à la description des méthodes utilisées pour répondre aux critères de la présente méthode d'essai, par exemple en ce qui concerne la concentration limite ou la taille des particules,

— la respirabilité des particules est abordée à la lumière des résultats d'ensemble, en particulier si les critères de taille des particules n'ont pu être remplis,

— la cohérence des méthodes utilisées pour déterminer les concentrations nominales et réelles, et la relation entre la concentration réelle et la concentration nominale, sont incluses dans l'appréciation d'ensemble de l'étude,

— la cause probable de la mort et le mode d'action prédominant (systémique ou local) sont abordés,

— une explication est apportée s'il a fallu euthanasier des animaux qui souffraient ou montraient des signes de détresse sévère et persistante, en se basant sur les critères du document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (7).

BIBLIOGRAPHIE:

(1) Chapitre B.2 de la présente annexe, Toxicité aiguë (inhalation).

(2) Holzhütter H.-G., Genschow E., Diener W., and Schlede E. (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Évaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243-254.

(3) Diener W., Kayser D. and Schlede E. (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Évaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537-549.

(4) Diener W. and Schlede E. (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. *ALTEX* 1: 129-134.

(5) Chapitre B.1 *ter* de la présente annexe, Toxicité orale aiguë — méthode de la classe de toxicité aiguë.

(6) OCDE (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 105, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (http://www.oecd.org/env/testguidelines).

(7) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Évaluation. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 19, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (http://www.oecd.org/env/testguidelines).

(8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 39, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (http://www.oecd.org/env/testguidelines).

(9) Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006 (JO L 353 du 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

(10) Chapitre B.40 de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: essai de résistance électrique transcutanée (RET).

(11) Chapitre B.40 *bis* de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: essai sur modèle de peau humaine.

(12) OCDE (2005). Méthode d'essai in vitro sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques n° 435, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (http://www.oecd.org/env/testguidelines).

(13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

(14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321-327.

(15) Pauluhn J. and Thiel A. (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167

(16) Nations unies (2007), Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH), ST/SG/AC.10/30, Nations unies, New York et Genève. Disponible sur l'internet (http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html).

▼**M4**

Appendice 1

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼M4

Appendice 2

Procédure à suivre pour chacune des concentrations initiales dans le cas des gaz (ppm/4 h)

Remarques générales ([1])

Pour chaque concentration initiale, les schémas d'essai figurant dans le présent appendice indiquent la procédure à suivre.

Appendice 2 bis: concentration initiale de 100 ppm.

Appendice 2 ter: concentration initiale de 500 ppm.

Appendice 2 quater: concentration initiale de 2 500 ppm.

Appendice 2 quinquies: concentration initiale de 20 000 ppm.

Selon le nombre d'animaux morts ou euthanasiés, la procédure d'essai se poursuit en suivant les flèches indiquées.

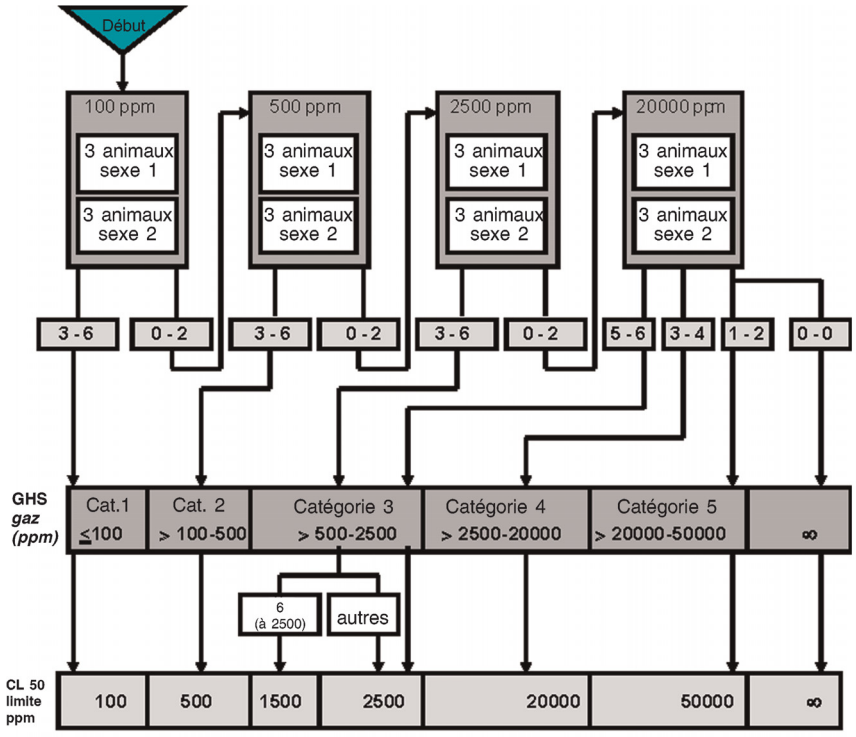
([1]) Les tableaux ci-après renvoient au système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). L'équivalent de ce système au sein de l'Union européenne est le règlement (CE) n° 1272/2008. Dans le cas de la toxicité aiguë par inhalation, le règlement (CE) n° 1272/2008 (9) ne prévoit pas la catégorie 5.

▼**M4**

Appendice 2 bis

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 100 ppm/4 h pour les gaz



— 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape

— 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/ concentration testée

— GHS: Système général harmonisé de classification

— ∞: non classé

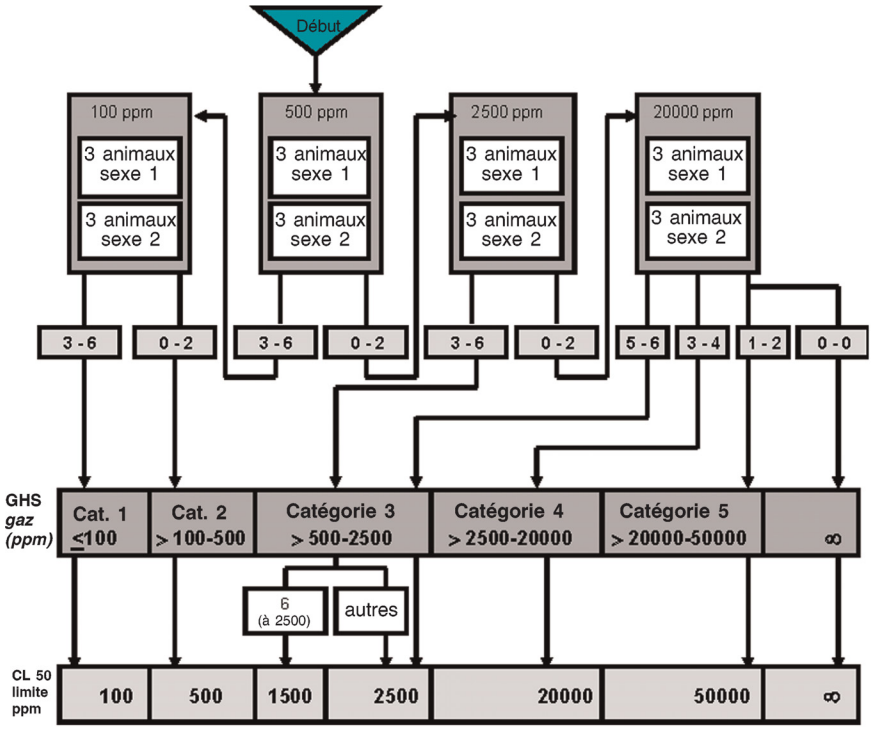
— Essai à ≥ 20 000 ppm/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼M4

Appendice 2 ter

Toxicité aiguë par inhalation:

procédure d'essai avec une concentration initiale de 500 ppm/4h pour les gaz



— 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape

— 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/ concentration testée

— SGH: Système général harmonisé de classification

— ∞: non classé

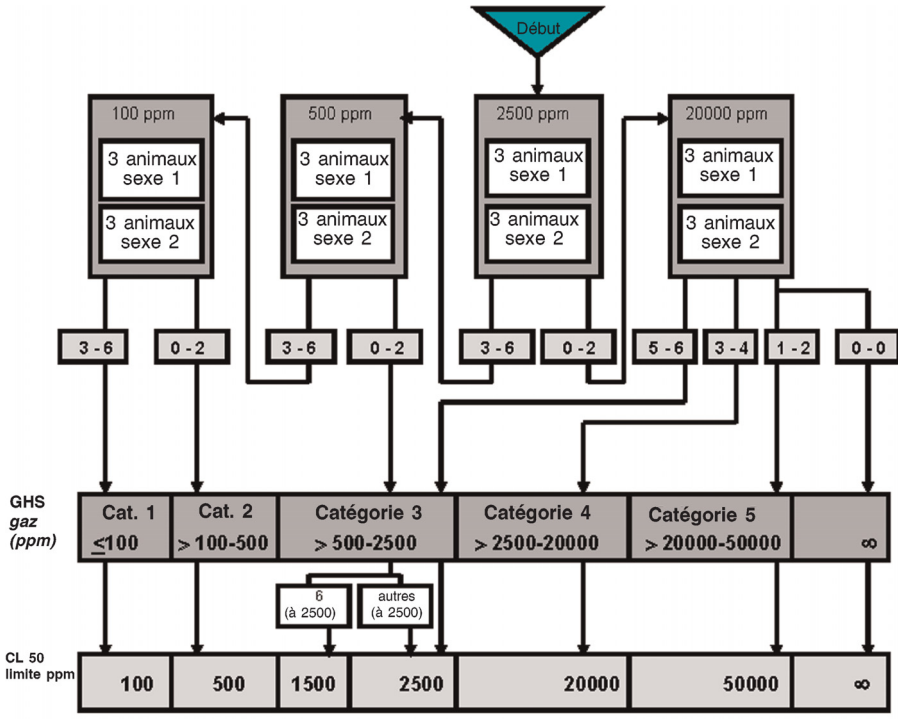
— Essai à ≥ 20 000 ppm/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼M4

Appendice 2 quater

Toxicité aiguë par inhalation:

procédure d'essai avec une concentration initiale de 2 500 ppm/4h pour les gaz



— 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape

— 0–6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée

— SGH: Système général harmonisé de classification

— ∞: non classé

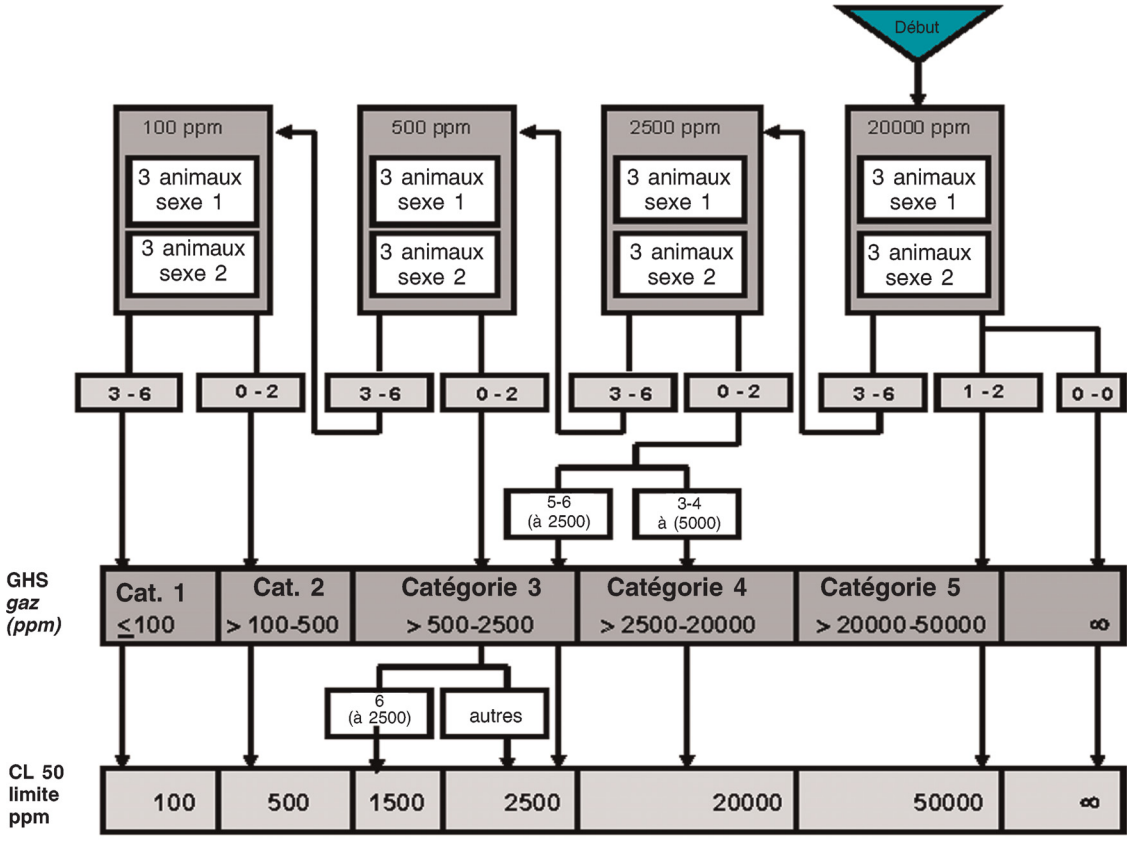
— Essai à ≥ 20 000 ppm/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼M4

Appendice 2 quinquies

Toxicité aiguë par inhalation:

procédure d'essai avec une concentration initiale de 20 000 ppm/4h pour les gaz



— 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape

— 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée

— SGH: Système général harmonisé de classification

— ∞: non classé

— Essai à ≥ 20 000 ppm/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼M4

Appendice 3

Procédure à suivre pour chacune des concentrations initiales dans le cas des vapeurs (mg/l/4 h)

Remarques générales ([1])

Pour chaque concentration initiale, les schémas d'essai figurant dans le présent appendice indiquent la procédure à suivre.

Appendice 3 *bis*: concentration initiale de 0,5 mg/l.

Appendice 3 *ter*: concentration initiale de 2,0 mg/l.

Appendice 3 *quater*: concentration initiale de 10 mg/l.

Appendice 3 *quinquies*: concentration initiale de 20 mg/l.

Selon le nombre d'animaux morts ou euthanasiés, la procédure d'essai se poursuit en suivant les flèches indiquées.

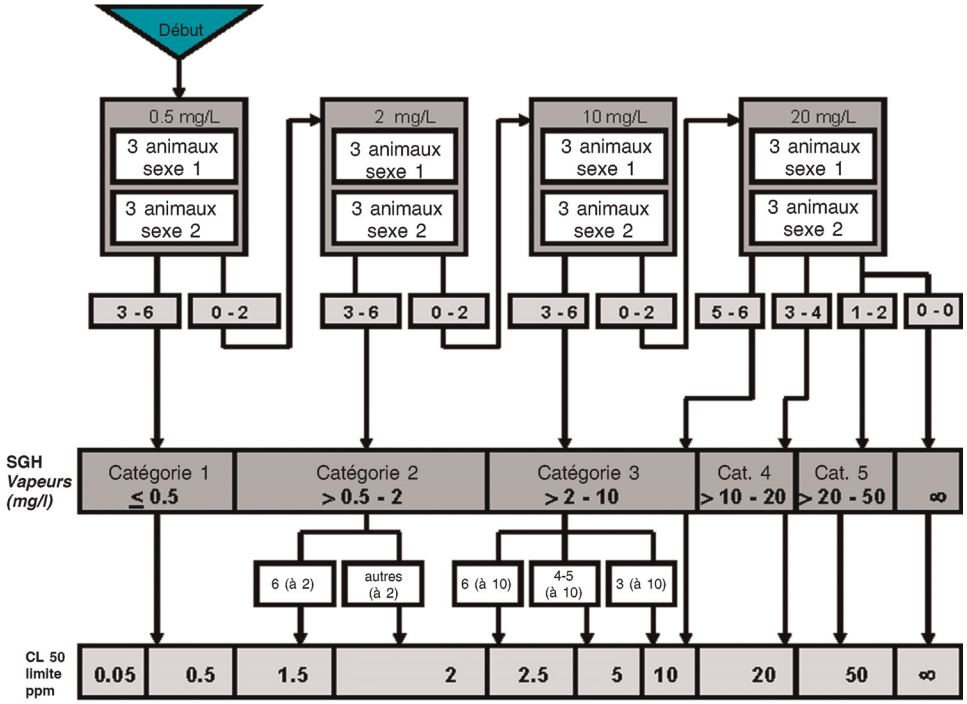
([1]) Les tableaux ci-après renvoient au système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). L'équivalent de ce système au sein de l'Union européenne est le règlement (CE) n° 1272/2008. Dans le cas de la toxicité aiguë par inhalation, le règlement (CE) n° 1272/2008 (9) ne prévoit pas la catégorie 5.

▼M4

Appendice 3 bis

Toxicité aiguë par inhalation:

procédure d'essai avec une concentration initiale de 0,5 mg/l/4h pour les vapeurs



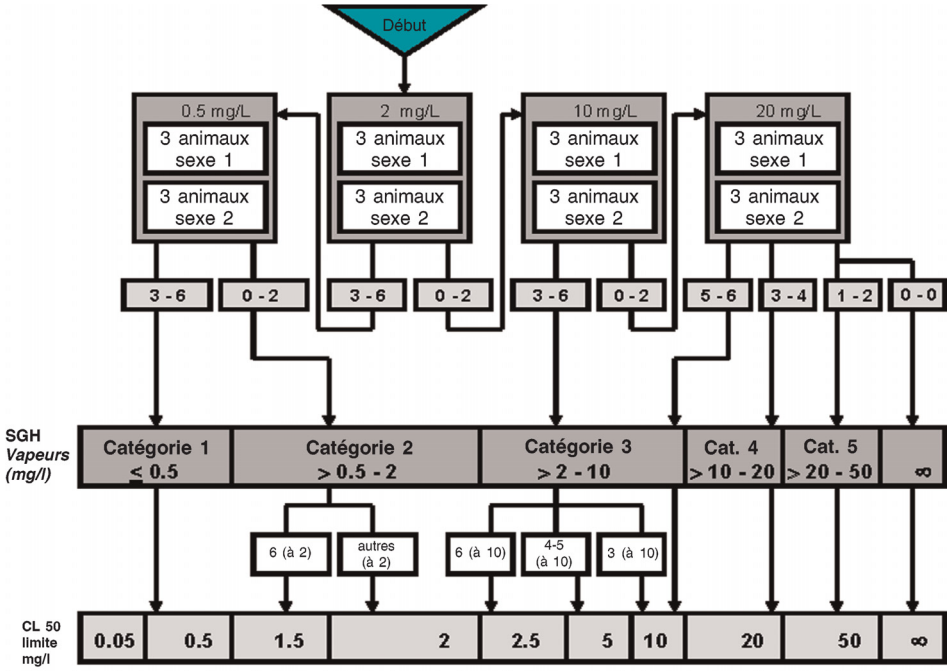
- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
- SGH: Système général harmonisé de classification
- ∞: non classé
- Essai à 50 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼M4

Appendice 3 ter

Toxicité aiguë par inhalation:

procédure d'essai avec une concentration initiale de 2 mg/l/4h pour les vapeurs



— 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape

— 0–6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée

— SGH: Système général harmonisé de classification

— ∞: non classé

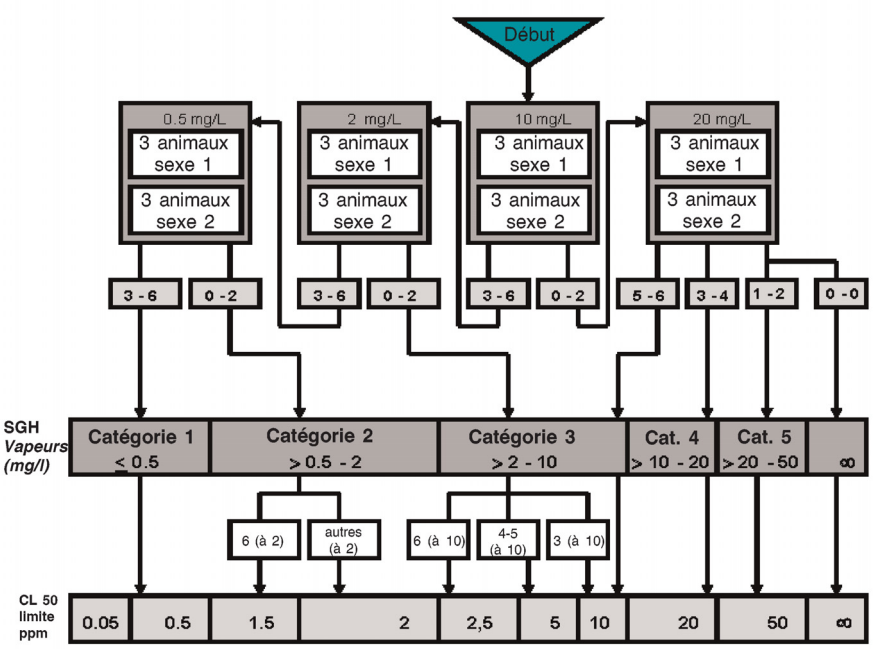
— Essai à 50 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼M4

Appendice 3 quater

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 10 mg/l/4h pour les vapeurs



— 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape

— 0–6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée

— SGH: Système général harmonisé de classification

— ∞: non classé

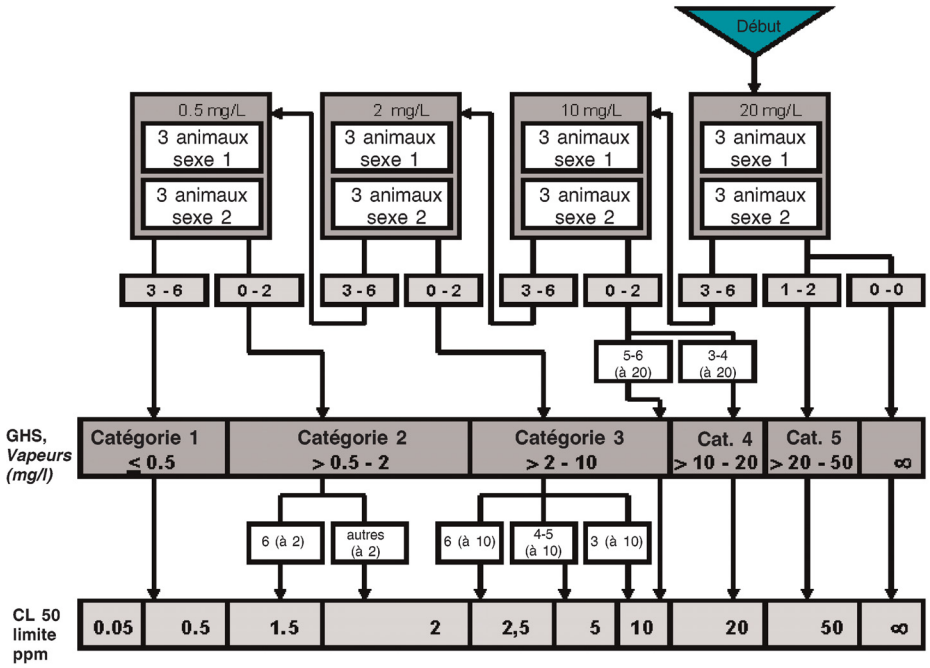
— Essai à 50 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼M4

Appendice 3 quinquies

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initialede 20 mg/l/4h pour les vapeurs



— 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape

— 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée

— SGH: Système général harmonisé de classification

— ∞: non classé

— Essai à 50 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼M4

Appendice 4

Procédure à suivre pour chacune des concentrations initiales dans le cas des aérosols (mg/l/4 h)

Remarques générales ([1])

Pour chaque concentration initiale, les schémas d'essai figurant dans le présent appendice indiquent la procédure à suivre.

Appendice 4 *bis*: concentration initiale de 0,05 mg/l.

Appendice 4 *ter*: concentration initiale de 0,5 mg/l.

Appendice 4 *quater*: concentration initiale de 1 mg/l.

Appendice 4 *quinquies*: concentration initiale de 5 mg/l.

Selon le nombre d'animaux morts ou euthanasiés, la procédure d'essai se poursuit en suivant les flèches indiquées.

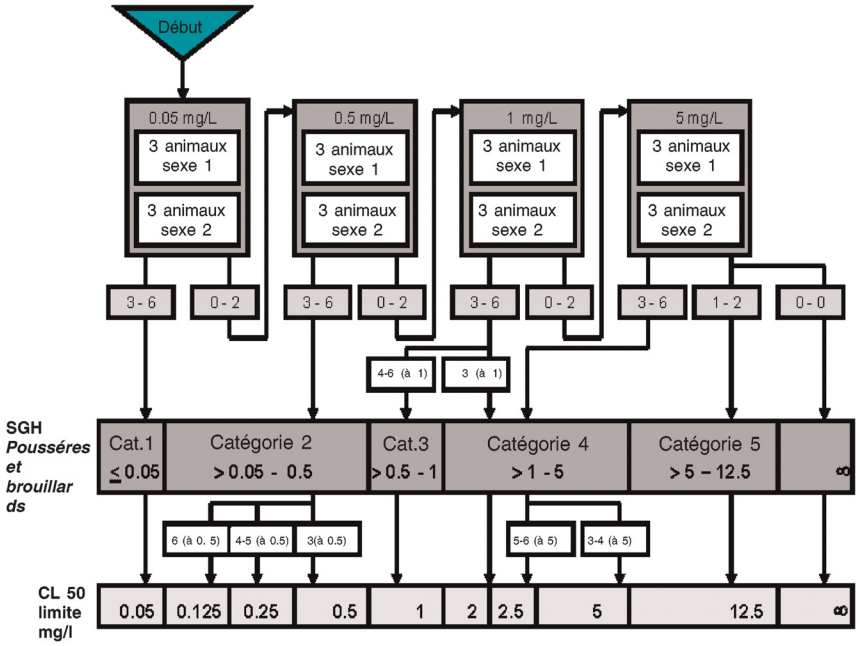
([1]) Les tableaux ci-après renvoient au système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). L'équivalent de ce système au sein de l'Union européenne est le règlement (CE) n° 1272/2008. Dans le cas de la toxicité aiguë par inhalation, le règlement (CE) n° 1272/2008 (9) ne prévoit pas la catégorie 5.

▼M4

Appendice 4 bis

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 0.05 mg/l/4h pour les vapeurs



— 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape

— 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée

— SGH: Système général harmonisé de classification

— ∞: non classé

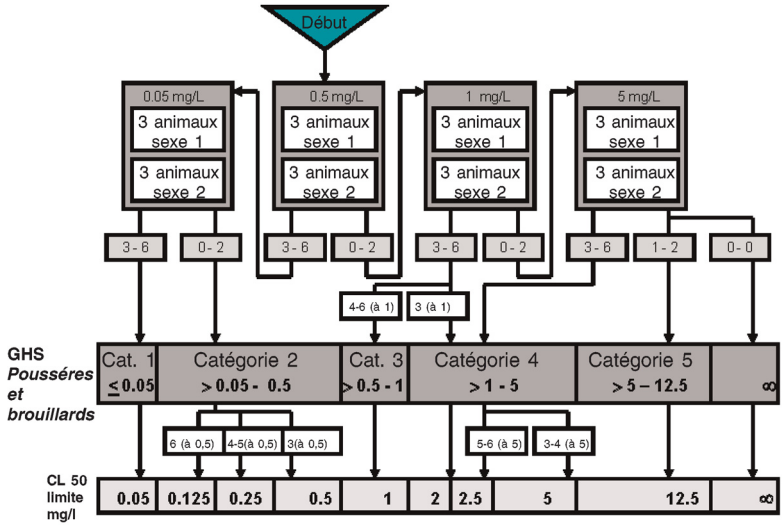
— Essai à 12,5 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼M4

Appendice 4 ter

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 0,5 mg/l/4h pour les aérosols



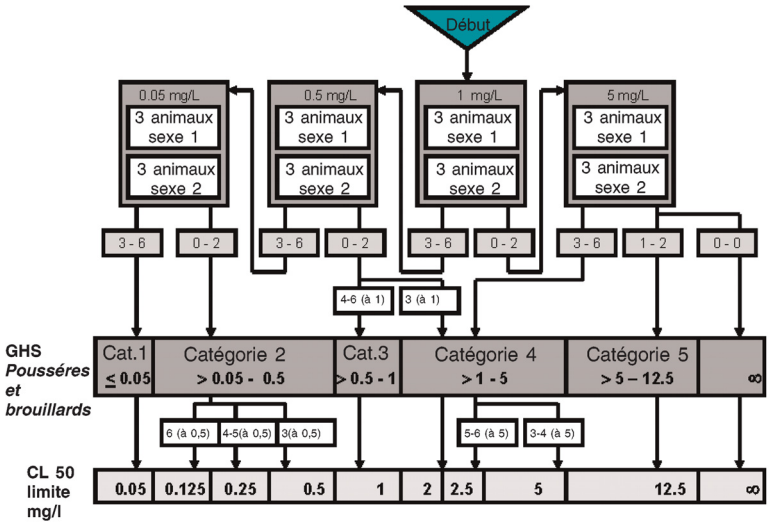
— 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
— 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
— GHS: Système général harmonisé de classification
— ∞: non classé
— Essai à 12,5 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼M4

Appendice 4 quater

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 1 mg/l/4h pour les aérosols



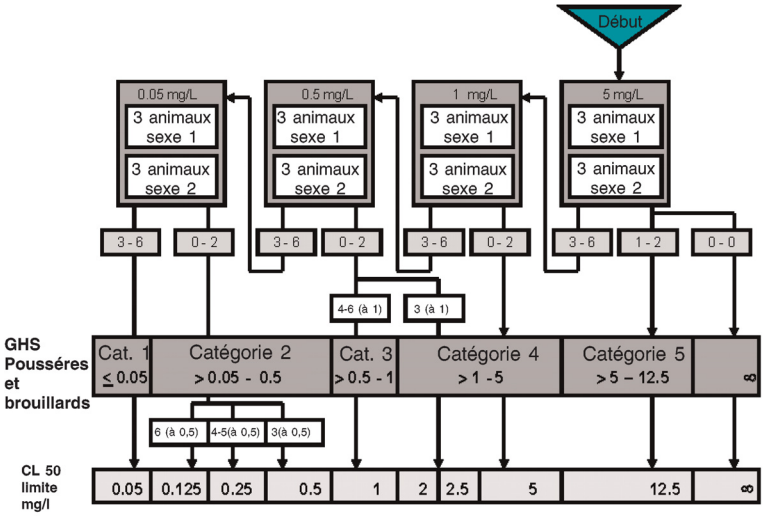
— 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
— 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
— GHS: Système général harmonisé de classification
— ∞: non classé
— Essai à 12,5 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼M4

Appendice 4 quinquies

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 5 mg/l/4h pour les aérosols



— 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
— 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
— GHS: Système général harmonisé de classification
— ∞: non classé
— Essai à 12,5 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)»

▼M5

B.53. ÉTUDE DE NEUROTOXICITE POUR LE DEVELOPPEMENT

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice pour les essais de produits chimiques n° 426 (2007) de l'OCDE. En juin 1995, à Copenhague, un groupe de travail de l'OCDE sur la toxicité pour la reproduction et le développement a débattu de la pertinence d'une actualisation des lignes directrices de l'OCDE existantes sur la toxicité pour la reproduction et le développement, et de l'élaboration de nouvelles lignes directrices sur des effets qui ne sont pas actuellement couverts (1). Le groupe de travail a recommandé la rédaction d'une ligne directrice concernant la neurotoxicité pour le développement, fondée sur une ligne directrice de l'Agence des États-Unis pour la protection de l'environnement (US EPA), révisée depuis (2). Une seconde réunion de consultation s'est tenue en juin 1996 à Copenhague avec pour objet de livrer au secrétariat des informations sur l'avant-projet d'une nouvelle ligne directrice sur la neurotoxicité pour le développement, notamment concernant des éléments majeurs tels que des précisions sur le choix de l'espèce animale, la période d'administration, la durée de l'essai, les effets à évaluer et les critères d'évaluation des résultats. L'US EPA a publié une ligne directrice sur l'évaluation des risques neurotoxiques en 1998 (3). Une consultation d'experts de l'OCDE et un atelier de travail de l'Institut des sciences du risque ISLI se sont tenus parallèlement en octobre 2000, tandis qu'une consultation d'experts a eu lieu à Tokyo en 2005. Ces rencontres avaient dans leur ensemble pour objectif de débattre de questions scientifiques et techniques relatives à l'actuelle ligne directrice, et les recommandations qui en ont résulté (4) (5) (6) (7) ont été prises en compte lors de l'élaboration de la présente méthode d'essai. Les documents d'orientation n° 43 'Reproductive Toxicity Testing and Assessment' (8) et n° 20 'Neurotoxicity testing' (9) contiennent d'autres informations sur la mise en œuvre, l'interprétation et la terminologie relatives à cette méthode d'essai.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

2. De nombreuses substances chimiques sont connues pour entraîner des effets neurotoxiques sur le développement chez l'homme et chez d'autres espèces (10) (11) (12) (13). Il est parfois nécessaire de déterminer la neurotoxicité potentielle pour le développement d'une substance chimique et d'estimer et d'évaluer ses caractéristiques toxiques. Les études de neurotoxicité pour le développement ont pour objectif de produire des résultats relatifs aux effets fonctionnels et morphologiques potentiels exercés sur le système nerveux en développement de la progéniture après exposition in utero et aux premiers stades de la vie, notamment des caractérisations par des courbes de réponse à la dose.

3. Une étude de neurotoxicité pour le développement peut être menée isolément, ou intégrée dans une étude de toxicité pour la reproduction et/ou de neurotoxicité chez l'adulte [par exemple méthodes d'essai B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)], ou encore annexée à une étude de toxicité pour le développement prénatal [par exemple méthode d'essai B.31 (17)]. Si l'étude est intégrée dans une autre étude ou annexée, il est impératif de maintenir l'intégrité des deux types d'études. Tous les essais doivent être conformes à la législation en vigueur et aux lignes directrices gouvernementales et institutionnelles applicables concernant l'utilisation des animaux de laboratoire à des fins de recherche (par exemple 18).

4. Le laboratoire qui mène l'essai doit tenir compte de toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de procéder à l'étude. Il s'agit notamment d'informations sur l'identité et la structure de la substance chimique, sur ses propriétés physico-chimiques, sur les résultats de tout autre essai de toxicité in vitro ou in vivo réalisé sur la substance, sur les données toxicologiques relatives à d'autres substances chimiques apparentées, ainsi que sur la ou les utilisations prévues de la substance. Ces renseignements sont nécessaires pour convaincre toutes les parties intéressées de l'intérêt de l'essai pour la protection de la santé humaine, et ils seront utiles pour déterminer la dose initiale appropriée.

▼M5

PRINCIPE DE L'ESSAI

5. La substance d'essai est administrée aux animaux pendant les périodes de gestation et de lactation. Les mères sont testées pour évaluer les effets sur les femelles gravides et allaitantes, avec pour objectif additionnel l'acquisition d'informations comparatives (entre mère et progéniture). La neurotoxicité est évaluée sur des descendants sélectionnés au hasard dans les portées. L'évaluation comprend des observations destinées à détecter des anomalies neurologiques macroscopiques et comportementales, notamment l'examen du développement physique, de l'ontogénie comportementale, de l'activité motrice, des fonctions motrices et sensorielles, et de l'apprentissage et de la mémoire, ainsi que l'évaluation pondérale du cerveau et de la neuropathologie au cours du développement postnatal et à l'âge adulte.

6. Lorsque la méthode d'essai est mise en œuvre dans le cadre d'une étude séparée, il est possible d'appliquer sur des animaux surnuméraires disponibles dans chaque groupe des protocoles spécifiques d'étude du neurocomportement, de neuropathologie, de neurochimie ou d'électrophysiologie susceptibles de compléter les résultats obtenus par les examens recommandés par la présente méthode d'essai (16) (19) (20) (21). Ces protocoles présentent un intérêt particulier lorsque l'observation empirique, les effets escomptés ou le mécanisme ou le mode d'action évoquent un type spécifique de neurotoxicité. Ces protocoles supplémentaires peuvent être appliqués aux mères aussi bien qu'aux petits. Il est également possible de recourir à d'autres protocoles ex vivo ou in vitro, sous réserve qu'ils n'altèrent pas l'intégrité des protocoles in vivo.

PRÉPARATIONS EN VUE DE L'ESSAI

Sélection de l'espèce animale

7. L'espèce animale expérimentale privilégiée est le rat; d'autres espèces peuvent être utilisées, s'il y a lieu. Toutefois, il convient de noter que le nombre de jours de gestation et de développement postnatal spécifiés dans cette méthode d'essai correspond à des souches de rats couramment utilisées, et que des durées comparables devront être choisies dans le cas de l'utilisation d'une autre espèce ou d'une souche inhabituelle. L'emploi d'une autre espèce sera justifié par des données toxicologiques, pharmacocinétiques, et/ou d'une autre nature. La légitimation du choix doit s'appuyer sur des évaluations neurocomportementales et neuropathologiques postnatales déjà disponibles, spécifiques de l'espèce. Lorsqu'un essai antérieur a produit des résultats préoccupants, il convient de se pencher sur l'espèce ou la souche utilisée pour cet essai. Les différentes souches de rat se caractérisent par des performances dissemblables et il convient donc de fournir les preuves démontrant que la souche sélectionnée présente une fécondité et une réactivité adéquates. La fiabilité et la sensibilité de la détection de la neurotoxicité pour le développement sur les autres espèces devront être documentées.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

8. La température du local abritant les animaux expérimentaux doit être de 22 ± 3 °C. L'humidité relative doit atteindre au moins 30 % et, de préférence, elle n'excédera pas 70 %, sauf pendant le nettoyage du local, mais il faut s'efforcer de la maintenir à 50-60 %. L'éclairage doit être artificiel, avec une alternance de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité. Il est possible d'inverser le cycle d'éclairage avant l'accouplement et pendant la durée de l'étude, afin de procéder aux évaluations des effets fonctionnels et comportementaux pendant la période d'obscurité (sous lumière rouge), c'est-à-dire pendant la période d'activité normale des animaux (22). Toute modification du cycle lumière-obscurité doit inclure une période d'acclimatation suffisante pour l'adaptation des animaux aux nouvelles conditions. L'alimentation correspond à des régimes de laboratoire conventionnels avec accès illimité à l'eau de boisson. Il y a lieu de consigner la nature des aliments et de l'eau et d'analyser ceux-ci pour détecter la présence de contaminants.

▼M5

9. Les animaux peuvent être logés individuellement ou réunis dans des cages en petits groupes du même sexe. L'accouplement doit avoir lieu dans des cages adaptées à cet usage. Dès confirmation de la copulation ou avant le 15e jour de gestation, les animaux fécondés doivent être placés individuellement dans des cages de mise bas ou de maternité. Cet équipement doit être aménagé pour réduire au minimum les éventuels effets de placement en cage. Les femelles fécondées disposeront de matériaux de nidification adéquats et bien définis aux abords de la mise bas. Il est notoire qu'une manipulation ou un stress superflu pendant la gestation peut provoquer des effets indésirables, notamment un avortement ou un développement fœtal ou postnatal perturbé. Afin de se prémunir contre une mortalité fœtale due à des facteurs non liés au traitement, il convient de manipuler avec soin les animaux pendant la gestation, et d'éviter tout stress exercé par des facteurs externes tels qu'un bruit excessif.

Préparation des animaux

10. Il faut utiliser des animaux sains, acclimatés aux conditions de laboratoire et n'ayant préalablement subi aucun traitement expérimental, à moins que l'étude ne soit incorporée dans une autre étude (voir paragraphe 3). Les animaux expérimentaux doivent être caractérisés en termes d'espèce, de souche, de source, de sexe, de poids et d'âge. Chaque animal doit être affecté et marqué d'un numéro d'identification individuel. Il convient de maintenir autant que possible une uniformité de poids et d'âge des animaux, dans tous les groupes de l'essai, et de se trouver dans la gamme de valeurs normales de l'espèce et de la souche étudiées. À chaque niveau de dose, il faut utiliser des animaux femelles nullipares adultes jeunes. Les individus d'une même fratrie ne peuvent pas être accouplés, et des précautions doivent être prises dans ce sens. Le jour de gestation (JG) 0 est le jour auquel on observe un bouchon vaginal et/ou des spermatozoïdes. Les animaux à gestation datée acquis auprès d'un fournisseur disposeront d'une période d'acclimatation adéquate (par exemple 2-3 jours). Les femelles fécondées doivent être affectées sans biais aux groupes témoin et de traitement et, dès que possible, uniformément réparties dans les groupes (par exemple il est recommandé d'employer un protocole aléatoire stratifié pour uniformiser la répartition entre tous les groupes, notamment fondé sur le poids corporel). Les femelles inséminées par le même mâle doivent être également réparties dans les groupes.

PROTOCOLE

Nombre et sexe des animaux

11. Chaque groupe traité et témoin doit contenir un nombre suffisant de femelles gravides exposées à la substance d'essai afin de garantir l'obtention d'un nombre adéquat de descendants pour évaluer la neurotoxicité. Un nombre total de 20 portées est recommandé pour chaque niveau de dose. Il est possible d'utiliser des modèles d'administration avec répétition des expériences et groupes échelonnés sous réserve que le nombre total de portées par groupe soit adéquat, et que des modèles statistiques appropriés soient utilisés pour tenir compte des expériences identiques.

12. Au jour 4 après la naissance (JAN 4) ou avant (le jour de la mise bas est JAN 0), la taille de chaque portée doit être ajustée en éliminant les petits en excès par sélection aléatoire pour que toutes les portées soient de taille identique (23). La taille de la portée ne doit pas dépasser la taille de portée moyenne pour la souche de rongeur utilisée (8-12). Les nombres de petits mâles et femelles doivent être aussi proches que possible de l'égalité. Il ne convient pas de procéder à une élimination sélective des petits basée, par exemple, sur le poids corporel. Après standardisation des portées (restriction) et avant toute analyse des effets fonctionnels, chaque petit sur lequel on a programmé des essais présevrage ou postsevrage doit être identifié individuellement par une méthode humaine adéquate d'identification des petits (par exemple 24).

▼M5

Affectation des animaux aux essais fonctionnels et comportementaux, aux mesures de poids du cerveau et aux évaluations neuropathologiques

13. La méthode d'essai admet des approches diverses quant à la répartition des animaux exposés in utero et via l'allaitement dans les différents essais fonctionnels et comportementaux, à la détermination de la maturité sexuelle et du poids du cerveau et à l'évaluation neuropathologique (25). Il est possible d'ajouter d'autres essais sur la fonction neurocomportementale (par exemple comportement social), ou des essais de neurochimie ou de neuropathologie, au cas par cas, à condition que l'intégrité des essais initiaux requis ne soit pas compromise.

14. Les petits sont sélectionnés dans chaque groupe de dose et affectés à une évaluation d'effet au JAN 4 ou après. La sélection des petits doit permettre, dans la mesure du possible, une représentation équilibrée des deux sexes de chaque portée, pour chaque groupe de dose, dans tous les essais. Dans le test d'activité motrice, il convient d'analyser la même paire de petits mâle et femelle à tous les âges de présevrage (voir paragraphe 35). Pour tous les autres essais, on peut affecter des paires identiques ou différentes d'animaux mâles et femelles aux différents essais comportementaux. Pour l'étude de la fonction cognitive, il peut s'avérer nécessaire d'affecter des petits différents aux essais sur animaux immatures et sur animaux adultes, afin d'éviter toute confusion entre les effets de l'âge et les effets d'un entraînement antérieur pour ces mesures (26) (27). Au moment du sevrage (JAN 21), les petits qui ne sont pas sélectionnés pour des tests peuvent être sacrifiés humainement. Toute modification de la répartition des petits doit être consignée. L'unité statistique de la mesure est la portée (ou la mère) et non le petit.

15. Il existe différentes façons de répartir les petits dans les examens présevrage et postsevrage, les essais cognitifs, les examens pathologiques, etc. (un modèle général est proposé à la figure 1 et des exemples de répartition sont présentés dans l'appendice 1). Il est recommandé d'employer les nombres minimaux suivants d'animaux dans chaque groupe de dose pour les examens présevrage et postsevrage:

Observations cliniques et poids corporel	Tous les animaux
Observations cliniques detaillées	20/sexe (1/sexe/portée)
Poids du cerveau (postfixation) JAN 11-22	10/sexe (1/portée)
Poids du cerveau (non fixé) ~JAN 70	10/sexe (1/portée)
Neuropathologie (fixation par immersion ou perfusion) JAN 11-22	10/sexe (1/portée)
Neuropathologie (fixation par perfusion) JAN ~70	10/sexe (1/portée)
Maturité sexuelle	20/sexe (1/sexe/portée)
Autres marqueurs du développement (facultatif)	Tous les animaux
Ontogénie comportementale	20/sexe (1/sexe/portée)
Activité motrice	20/sexe (1/sexe/portée)
Fonction motrice et sensorielle	20/sexe (1/sexe/portée)
Apprentissage et mémoire	10/sexe ([a]) (1/portée)

([a]) Selon la sensibilité des essais de fonction cognitive, il faut parfois envisager d'étudier un plus grand nombre d'animaux, par exemple 1 mâle et 1 femelle par portée (pour la répartition des animaux, se reporter à l'appendice 1) [d'autres recommandations sur la taille de l'échantillon sont fournies dans le document d'orientation no 43 de l'OCDE (8)].

▼M5

Dosage

16. On doit utiliser au moins trois niveaux de doses différents et un groupe témoin en parallèle. Les niveaux de dose doivent être espacés de façon à produire une gradation des effets toxiques. Si elle n'est pas limitée par les propriétés physico-chimiques ou biologiques de la substance d'essai, la dose la plus élevée doit être choisie en vue d'induire une certaine toxicité pour la mère [par exemple signes cliniques, diminution du gain de poids corporel (pas plus de 10 %) et/ou preuve de toxicité limitée par la dose dans un organe cible]. La dose élevée ne doit pas dépasser 1 000 mg/kg/jour de poids corporel, sauf exception, par exemple, si l'exposition humaine prévue indique qu'il est nécessaire d'utiliser une dose plus élevée. Il est également possible de mener des études pilotes ou des études préliminaires de détermination d'un ordre de grandeur afin de définir la dose la plus élevée qu'il faut utiliser pour produire une toxicité minimale pour la mère. Lorsque la substance d'essai s'est révélée toxique sur le plan du développement dans une étude standard de toxicité pour le développement ou dans une étude pilote, la dose la plus élevée doit être la dose maximale qui n'induit pas de toxicité excessive pour la descendance, ni de mort in utero ou néonatale, ni de malformations, qui empêcherait une évaluation significative de la neurotoxicité. La dose la plus faible ne doit produire aucun signe de toxicité pour la mère ni de toxicité pour le développement, notamment de neurotoxicité. Il convient de sélectionner une séquence de doses décroissantes en vue de mettre en évidence une relation dose-effet et une concentration sans effet nocif observé (CSENO), ou des doses proches de la limite de détection permettant de déterminer un niveau de référence. Les intervalles optimaux au sein d'une séquence de doses décroissantes sont souvent d'un facteur de 2 à 4 et l'adjonction d'un quatrième groupe de dose est souvent préférable à l'administration de doses très espacées (par exemple par un facteur de plus de 10).

17. Il convient de choisir des niveaux de dose en considérant toutes les données existantes sur la toxicité ainsi que d'autres informations sur le métabolisme et la toxicocinétique de la substance d'essai ou de composés apparentés. Ces informations contribueront également à justifier l'échelle des doses. Il faut envisager l'administration directe aux petits en se fondant sur des informations relatives à l'exposition et à la pharmacocinétique (28) (29). Il faudra soigneusement évaluer les avantages et les inconvénients avant la mise en œuvre d'études d'administration directe (30).

18. Le groupe témoin étudié en parallèle doit être un groupe témoin fictivement traité ou un groupe témoin traité par le véhicule, lorsqu'un véhicule est utilisé pour administrer la substance d'essai. Tous les groupes doivent recevoir le même volume de substance d'essai ou de véhicule, rapporté au poids corporel. Lorsqu'un véhicule ou un autre adjuvant est utilisé pour faciliter l'administration, il convient de tenir compte des caractéristiques suivantes: effets sur l'absorption, la distribution, le métabolisme, ou la rétention de la substance d'essai; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier ses caractéristiques toxiques; effets sur la consommation d'aliments ou d'eau ou l'état nutritionnel des animaux. Le véhicule ne doit provoquer aucun effet susceptible d'interférer avec l'interprétation de l'étude et ne doit induire aucune toxicité sur le plan neurocomportemental, ni exercer d'effets sur la reproduction ou le développement. Dans le cas de l'utilisation de nouveaux véhicules, il convient d'inclure dans l'étude, outre le groupe véhicule témoin, un groupe témoin fictivement traité. Les animaux inclus dans le ou les groupes témoins doivent être manipulés exactement comme les animaux des groupes d'essai.

▼M5

Administration des doses

19. La substance d'essai ou le véhicule doivent être administrés par la voie la plus représentative de l'exposition humaine potentielle, en fondant le choix sur des informations disponibles sur le métabolisme et la distribution dans les animaux expérimentaux. La voie d'administration sera généralement orale (par exemple gavage, aliments ou eau de boisson), mais il est possible d'utiliser d'autres voies (par exemple voie cutanée, inhalation), justifiées par des caractéristiques particulières ou des voies d'exposition de l'homme envisagées ou connues [d'autres informations sont fournies dans le document d'orientation n° 43 (8)]. Il convient de motiver le choix de la voie d'administration. La substance d'essai doit être administrée tous les jours à peu près au même moment.

20. La dose administrée à chaque animal dépend normalement de la mesure la plus récente du poids corporel du sujet. Toutefois, les doses devront être ajustées avec précaution dans le dernier tiers de la gestation. Si une toxicité excessive est observée sur les mères traitées, elles seront humainement sacrifiées.

21. La substance d'essai ou le véhicule doivent être administrés au minimum quotidiennement aux femelles fécondées à partir du moment de l'implantation (JG 6) et jusqu'à la fin de la lactation (JAN 21), de façon à exposer les petits à la substance d'essai pendant le développement neurologique prénatal et postnatal. L'âge au début de l'administration et la durée et la fréquence des administrations peuvent être ajustés, s'il est démontré qu'un autre modèle expérimental correspond mieux aux expositions de l'homme. Les durées d'administration doivent être adaptées aux autres espèces de façon à garantir une exposition pendant toutes les périodes précoces du développement du cerveau (c'est-à-dire équivalentes à la croissance cérébrale humaine prénatale et postnatale précoce). Il est possible de commencer l'administration au début de la gestation (JG 0), mais il convient d'envisager que la substance d'essai puisse entraîner une perte préimplantatoire. Le choix d'une administration à partir du JG 6 permettrait d'écarter ce risque, mais les stades du développement compris entre JG 0 et 6 ne seraient alors pas traités. Il est impossible de commencer l'administration à JG 0 sur des animaux à accouplement daté acquis par le laboratoire, et JG 6 semble par conséquent un bon compromis de jour de départ. Le laboratoire d'essai prendra soin d'ajuster le régime posologique conformément aux informations pertinentes dont il dispose sur les effets de la substance d'essai, avant l'expérience, et conformément à des considérations logistiques, notamment par le prolongement de l'administration après le sevrage. Il est préférable d'interrompre l'administration le jour de la parturition chez les animaux qui n'ont pas mis bas tous leurs descendants. On estime en général que les petits sont exposés par l'intermédiaire du lait maternel; toutefois, l'administration directe aux petits doit être envisagée dans les cas d'absence de preuve d'une exposition continue de la progéniture. Ces preuves peuvent être tirées, par exemple, d'informations pharmacocinétiques, de toxicité sur la progéniture ou de modification des marqueurs biologiques (28).

OBSERVATIONS

Observations sur les mères

22. Toutes les mères doivent faire l'objet d'une observation attentive au moins une fois par jour, afin de constater leur état de santé et de relever la morbidité et la mortalité.

23. Pendant les périodes de traitement et d'observation, des examens cliniques plus détaillés sont périodiquement menés (au moins deux fois pendant la période d'administration au cours de la gestation et deux fois pendant la période d'administration au cours de la lactation), en employant au moins dix mères par dose. Les animaux doivent être observés à l'extérieur de leur cage d'habitation, par des techniciens formés ignorant le traitement des animaux, et suivant des protocoles normalisés visant à limiter autant que possible les biais liés au stress des animaux, à l'observateur, et à optimiser la reproductibilité interobservateurs. Dans la mesure du possible, il est préférable que toutes les observations d'une étude donnée soient réalisées par le même technicien.

▼M5

24. La présence de signes observés doit être consignée. Autant que possible, leur ampleur doit également être notée. Les observations cliniques incluront, sans s'y limiter, des modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux, des muqueuses, la présence de sécrétions, et l'activité autonome (par exemple larmoiement, horripilation, taille des pupilles, mode de respiration inhabituel, et/ou respiration par la bouche, et tous signes inhabituels de miction ou défécation).

25. Il faut également noter toutes les réactions inhabituelles dans la position du corps, le niveau d'activité (par exemple augmentation ou diminution de l'exploration de la zone standard) et la coordination des mouvements. Les modifications de la marche (par exemple marche en canard, ataxie), de la posture (par exemple dos rond) et de la réactivité à la manipulation, à la pose ou à d'autres stimuli environnementaux, ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, de convulsions, de tremblements, de stéréotypies (par exemple toilettage excessif, mouvements inhabituels de la tête, déplacements répétés en cercle), de comportements étranges (par exemple morsures ou léchage excessif, automutilation, marche à reculons, vocalisation), ou d'agression doivent être enregistrés.

26. Les signes de toxicité doivent être enregistrés, notamment le jour de leur apparition, le moment de la journée, leur degré et leur durée.

27. Les animaux sont pesés au moment de l'administration au moins une fois par semaine pendant toute l'étude, ou le jour de la mise bas ou à un moment proche de ce jour et à JAN 21 (sevrage). Dans les études par gavage, les mères doivent être pesées au moins deux fois par semaine. Les doses sont ajustées au moment de chaque pesée, s'il y a lieu. La consommation d'aliments est mesurée une fois par semaine au moins pendant la gestation et la lactation. La consommation d'eau doit être mesurée au moins une fois par semaine si les animaux sont exposés par l'eau de boisson.

Observations sur la progéniture

28. Tous les petits doivent être attentivement examinés au moins quotidiennement pour détecter les signes de toxicité et déterminer la morbidité et la mortalité.

29. Pendant les périodes de traitement et d'observation, des examens cliniques plus détaillés des descendants doivent être réalisés. La progéniture (au moins un petit/sexe/portée) doit être observée par des techniciens formés ignorant le traitement des animaux, suivant des protocoles normalisés visant à réduire au minimum les biais et à optimiser la reproductibilité interobservateurs. Dans la mesure du possible, il est préférable que les observations soient réalisées par le même technicien. On contrôlera au minimum les effets décrits dans les paragraphes 24 et 25, s'ils s'appliquent au stade du développement étudié.

30. Tous les signes de toxicité sur la progéniture doivent être consignés, notamment le jour de leur apparition, le moment de la journée, leur degré et leur durée.

Marqueurs physiques et développementaux

31. Les modifications des marqueurs du développement antérieurs au sevrage (par exemple dépliement du pavillon de l'oreille, ouverture des yeux, poussée des incisives) sont étroitement corrélées au poids corporel (30) (31). Le poids corporel est donc souvent le meilleur indicateur du développement physique. Il est par conséquent recommandé de mesurer les marqueurs de développement uniquement lorsque les indices préalables suggèrent que ces données fourniront de nouvelles informations. Le calendrier d'évaluation de ces paramètres est indiqué dans le tableau 1. En se fondant sur les effets anticipés et les résultats des mesures initiales, il peut être judicieux d'ajouter d'autres dates d'examen ou de réaliser les mesures à d'autres stades du développement.

▼M5

32. Il est préférable d'utiliser l'âge postcoïtal plutôt que l'âge postnatal pour évaluer le développement physique (33). Si l'essai est réalisé le jour du sevrage, il est recommandé d'examiner les petits avant sevrage effectif pour éviter toute confusion avec l'effet du stress associé au sevrage. De surcroît, on ne procédera à aucun examen postsevrage des petits au cours des deux jours qui suivent cet événement.

Tableau 1

Calendrier d'évaluation des marqueurs physiques et développementaux, et des effets fonctionnels/comportementaux ([a])

Âges / Effets	Présevrage ([b])	Adolescence ([b])	Jeunes adultes ([b])
Marqueurs physiques et développementaux			
Poids corporel et observations cliniques	hebdomadaire ([c])	au moins toutes les deux semaines	au moins toutes les deux semaines
Poids du cerveau	JAN 22 ([d])		à la fin
Neuropathologie	JAN 22 ([d])		à la fin
Maturité sexuelle	—	en temps opportun	—
Autres marqueurs du développement ([e])	s'il y a lieu	—	—
Effets fonctionnels/comportementaux			
Ontogénie comportementale	au moins deux mesures		
Activité motrice (y compris accoutumance)	1-3 fois ([f])	—	une fois
Fonction motrice et sensorielle	—	une fois	une fois
Apprentissage et mémoire	—	une fois	une fois

([a]) Ce tableau présente le nombre minimal de mesures à réaliser. En fonction des effets anticipés et des résultats des mesures initiales, il peut être judicieux d'ajouter d'autres dates d'examen (par exemple sur animaux âgés) ou de réaliser les mesures à d'autres stades du développement.

([b]) Il est recommandé de suspendre l'essai sur les petits pendant les deux jours qui suivent le sevrage (voir paragraphe 32). Les dates suivantes sont conseillées pour les essais sur adolescents: apprentissage et mémoire = JAN 25 ± 2; fonction motrice et sensorielle = JAN 25 ± 2. Les âges recommandés pour les essais sur jeunes adultes sont JAN 60-70.

([c]) Il convient de mesurer les masses corporelles au moins deux fois par semaine dans le cas d'une administration directe sur les petits afin d'ajuster les doses pendant la période de gain de masse corporelle rapide.

([d]) Le poids du cerveau et la neuropathologie peuvent être évalués plus tôt (par exemple JAN 11), si nécessaire (voir paragraphe 39).

([e]) Le cas échéant, d'autres marqueurs du développement, outre le poids corporel (par exemple ouverture des yeux), seront consignés (voir paragraphe 31).

([f]) Voir paragraphe 35.

33. Les petits vivants doivent être comptés et sexés, par exemple, par examen visuel ou mesure de la distance ano-génitale (34) (35), et chaque petit d'une portée doit être pesé individuellement à la naissance ou peu après, puis au moins une fois par semaine pendant l'allaitement, et au moins toutes les deux semaines par la suite. Pour évaluer la maturité sexuelle, il faut déterminer l'âge et la masse corporelle de l'animal à l'apparition de la perméabilité vaginale (36) ou de la séparation prépuciale (37) sur au moins un mâle et une femelle par portée.

▼M5

Ontogénie comportementale

34. L'ontogénie des comportements sélectionnés doit être mesurée sur au moins un petit/sexe/portée pendant la période d'âge appropriée, et sur les mêmes petits à toutes les dates d'essai pour tous les comportements évalués. Il convient d'espacer uniformément les dates de mesure sur cette période, afin de déterminer si la modification de l'ontogénie de ce comportement est normale ou liée au traitement (38). Quelques exemples de comportements susceptibles de donner lieu à une évaluation de l'ontogénie sont les suivants: réflexe de redressement, géotaxie négative et activité motrice (38) (39) (40).

Activité motrice

35. L'activité motrice doit être suivie (41) (42) (43) (44) (45) pendant la période préalable au sevrage et à l'âge adulte. La mise en œuvre de l'essai au moment du sevrage est décrite au paragraphe 32. La longueur de la session d'essai doit permettre de démontrer l'accoutumance intrasession des témoins non traités. Il est vivement recommandé d'utiliser l'activité motrice pour évaluer l'ontogénie comportementale. Dans un essai d'ontogénie comportementale, il faut utiliser les mêmes animaux dans toutes les sessions d'essai préalables au sevrage. Les observations doivent être suffisamment fréquentes pour permettre d'évaluer l'ontogénie de l'accoutumance intrasession (44). À cet effet, l'essai peut demander trois examens ou davantage avant le sevrage, jour du sevrage compris (par exemple JAN 13, 17, 21). Il convient également d'analyser les mêmes animaux, ou des animaux de la fratrie, à l'âge adulte vers la fin de l'étude (par exemple à JAN 60-70). Si nécessaire, des dates d'essai peuvent être ajoutées. L'activité motrice doit être contrôlée par un appareil d'enregistrement automatique capable de détecter aussi bien des augmentations que des diminutions d'activité (c'est-à-dire que l'activité de base mesurée par le dispositif ne doit pas être trop modérée, ce qui empêcherait la détection des diminutions d'activité, ni trop élevée, ce qui empêcherait la détection d'augmentations). Tous les appareils seront testés par des protocoles standard afin de garantir, dans la mesure du possible, la reproductibilité entre appareils et entre dates de mesure. Il conviendra d'équilibrer au mieux les groupes de traitement affectés à chaque appareil. Chaque animal doit être testé individuellement. Il faut répartir les groupes d'évaluation de l'essai sur la journée pour tenir compte des rythmes d'activité circadiens. On s'attachera particulièrement à réduire au minimum les variations affectant les conditions de l'essai et à éviter de les rattacher systématiquement au traitement. Les variables susceptibles d'affecter de nombreuses mesures du comportement, notamment l'activité motrice, comprennent l'intensité du bruit, les dimensions et la forme de la cage de l'essai, la température, l'humidité relative, les conditions de luminosité, les odeurs, l'utilisation de la cage d'habitation pour les tests ou d'une nouvelle cage d'essai et les distractions dues à l'environnement.

Fonction motrice et sensorielle

36. Les fonctions motrices et sensorielles doivent être étudiées en détail au moins une fois pendant la période de l'adolescence et une fois à l'âge jeune adulte (par exemple JAN 60-70). Pour procéder aux essais au moment du sevrage, se reporter au paragraphe 32. Il convient de mener les expériences en nombre suffisant pour garantir un échantillonnage quantitatif approprié des modalités sensorielles (par exemple somato-sensorielle, vestibulaire) et des fonctions motrices (par exemple force, coordination). La réponse à la poussée (46), le réflexe de redressement (47) (48), l'accoutumance au sursaut auditif (40) (49) (50) (51) (52) (53) (54), et les potentiels évoqués (55) comptent parmi les exemples de tests des fonctions motrices et sensorielles.

▼M5

Essais d'apprentissage et de mémoire

37. Un essai d'apprentissage associatif et de mémoire doit être mené après le sevrage (par exemple 25 ± 2 jours) et chez les jeunes adultes (JAN 60 et plus). Pour ce qui est de l'essai au moment du sevrage, on se reportera au paragraphe 32. Il est possible d'utiliser des essais identiques ou différents aux deux stades de développement. Le choix du ou des essais d'apprentissage et de mémoire chez les rats sevrés et adultes reste relativement libre, mais les tests doivent satisfaire deux critères. Tout d'abord, l'apprentissage doit être évalué soit comme un changement au cours de plusieurs tests ou sessions répétées d'apprentissage, ou bien, dans des essais mettant en œuvre un seul test, par référence à une condition expérimentale qui contrôle les effets non associatifs de l'entraînement. De plus, le ou les essais doivent inclure une mesure de la mémoire (à court terme ou à long terme) en plus de l'apprentissage initial (acquisition), mais cette mesure de mémoire n'a pas lieu d'être rapportée si une mesure d'acquisition n'a pas été obtenue dans le même essai. Dans le cas où le ou les essais d'apprentissage et de mémoire démontrent un effet de la substance d'essai, il convient d'envisager l'utilisation d'autres tests visant à éliminer toute interprétation fondée sur des altérations des capacités sensorielles, de motivation et/ou motrices. Outre ces deux critères, il est recommandé de choisir l'essai d'apprentissage et de mémoire en tenant compte de sa sensibilité démontrée à la classe de la substance chimique à l'étude, dans la mesure où cette information est disponible dans la littérature. Si elle ne l'est pas, la liste ci-dessous propose des tests qui peuvent être réalisés pour satisfaire aux critères mentionnés plus haut dans ce paragraphe: test d'évitement passif (43) (56) (57), appariement retardé de la position pour le rat adulte (58) et pour le rat avant sevrage (59), conditionnement olfactif (43) (60), labyrinthe d'eau de Morris (61) (62) (63), labyrinthe de Biel ou de Cincinnati (64) (65), labyrinthe à bras radiaux (66), labyrinthe en T (43), acquisition et rétention d'un comportement programmé (26) (67) (68). D'autres essais décrits dans la littérature s'appliquent aux rats sevrés (26) (27) et adultes (19) (20).

Autopsie

38. Les mères peuvent être euthanasiées après sevrage de leur progéniture.

39. L'évaluation neuropathologique des descendants sera menée sur des tissus prélevés sur des animaux humainement sacrifiés au JAN 22 ou plus tôt dans l'étude, entre JAN 11 et JAN 22, et également à la fin de l'étude. Les tissus cérébraux doivent être examinés sur les petits sacrifiés jusqu'au JAN 22; sur les animaux sacrifiés à la fin de l'étude, on évaluera les tissus du système nerveux central (SNC) et du système nerveux périphérique (SNP). Les tissus des animaux sacrifiés au JAN 22 ou plus tôt peuvent être fixés par immersion ou perfusion. Ceux des animaux tués à la fin de l'étude doivent être fixés par perfusion. Tous les aspects de la préparation des échantillons de tissus, depuis la perfusion des animaux jusqu'à la dissection des échantillons de tissus, au traitement des tissus et à la coloration des lames, devront respecter un plan expérimental contrebalancé tel que chaque lot contienne des échantillons représentatifs de chaque groupe de dose. Le document d'orientation n° 20 de l'OCDE (9) contient des informations supplémentaires sur la neuropathologie [voir également (103)].

Traitement des échantillons de tissus

40. Toutes les anomalies macroscopiques évidentes au moment de l'autopsie doivent être consignées. Les échantillons de tissus prélevés doivent représenter les principales régions du système nerveux. Les échantillons sont conservés dans un fixateur approprié et traités en suivant des protocoles histologiques publiés normalisés (69) (70) (71) (103). L'inclusion dans la paraffine est acceptée pour les tissus du SNC et du SNP, mais l'utilisation d'osmium lors de la postfixation, associée à des inclusions dans une résine époxy, convient parfois mieux lorsqu'un degré plus élevé de résolution est

▼M5

requis (par exemple pour les nerfs périphériques, en cas de suspicion d'une neuropathie périphérique ou pour une analyse morphométrique des nerfs périphériques). Les tissus cérébraux prélevés à des fins d'analyse morphométrique doivent être inclus dans un milieu approprié, simultanément pour toutes les doses, afin d'éviter les artefacts de rétrécissement parfois associés à un stockage prolongé dans le fixateur (6).

Examen neuropathologique

41. L'examen qualitatif a les objectifs suivants:

i) repérer les régions du système nerveux présentant des indices d'altérations neuropathologiques;

ii) recenser les types d'altérations neuropathologiques provoqués par l'exposition à la substance d'essai, et

iii) évaluer la gravité des altérations neuropathologiques.

Des coupes histologiques représentatives des échantillons de tissus doivent être examinées au microscope par un pathologiste de formation adéquate afin de détecter des altérations neuropathologiques. Toutes les altérations détectées seront caractérisées par un degré de gravité subjectif. Une coloration hématoxyline et éosine suffisent souvent pour évaluer les coupes de cerveau des animaux humainement sacrifiés à JAN 22 ou plus tôt. Toutefois, une coloration de la myéline (par exemple fast blue luxol/violet de crésyl) et une coloration à l'argent (par exemple colorations de Bielschowsky ou de Bodians) sont recommandées pour les coupes de tissus du SNC et du SNP prélevés sur les animaux sacrifiés à la fin de l'étude. Le pathologiste appréciera, en s'appuyant sur son expérience professionnelle et sur la nature des altérations observées, s'il convient d'utiliser d'autres colorations afin de repérer et de caractériser des types d'altérations particuliers [par exemple protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) ou histochimie de la lectine pour estimer les altérations gliales et microgliales (72), fluoro-jade pour détecter les nécroses (73) (74), ou coloration à l'argent spécifique de la dégénérescence neurale (75)].

42. Il convient d'effectuer une évaluation morphométrique (quantitative), car ces données peuvent contribuer à détecter un effet lié au traitement et sont utiles à l'interprétation des différences liées au traitement au niveau du poids du cerveau ou de la morphologie (76) (77). Des échantillons de tissu nerveux sont prélevés et préparés en vue d'une évaluation morphométrique. Il faut inclure, par exemple, des mesures linéaires ou surfaciques de régions spécifiques du cerveau (78). De telles mesures se pratiquent sur des coupes homologues soigneusement sélectionnées grâce à des repères microscopiques fiables (6). La stéréologie peut permettre d'identifier des effets liés au traitement sur des paramètres tels que le volume ou le nombre de cellules spécifiques de régions neuroanatomiques (79) (80) (81) (82) (83) (84).

43. On recherchera par l'examen des cerveaux tous les indices d'altérations neuropathologiques associés au traitement, sur des échantillons adéquats prélevés dans les principales régions du cerveau [par exemple bulbes olfactifs, cortex cérébral, hippocampe, noyaux basaux, thalamus, hypothalamus, mésencéphale (tectum, calotte, pédoncules cérébraux), pont, bulbe rachidien, cervelet], en s'efforçant de procéder à un examen exhaustif. Il est important que les coupes soient prélevées dans le même plan sur tous les animaux. Sur les adultes humainement sacrifiés à la fin de l'étude, il faut prélever des sections représentatives de la moelle épinière et du SNP. Les zones étudiées doivent comprendre l'œil avec le nerf optique et la rétine, la moelle épinière au niveau des renflements cervicaux et lombaires, les fibres de la chaîne dorsale et ventrale, le nerf sciatique proximal, le nerf tibial proximal (au niveau du genou), et les ramifications du nerf tibial au niveau des muscles du mollet. La moelle épinière et les nerfs périphériques doivent être représentés par des sections transversales et longitudinales.

▼M5

44. L'évaluation neuropathologique doit comprendre un examen permettant de détecter des indices de dommages affectant le développement du système nerveux (6) (85) (86) (87) (88) (89), en plus des altérations cellulaires (par exemple vacuolisation neuronale, dégénérescence, nécrose) et des modifications tissulaires (par exemple gliose, infiltration leucocytaire, formation de kystes). À cet égard, il est important de distinguer les effets liés au traitement des événements normaux du développement qui surviennent habituellement au stade correspondant au moment du sacrifice (90). Quelques exemples d'altérations significatives, indicatrices d'effets préjudiciables au développement sont cités ci-dessous:

— modification des dimensions ou de la forme des bulbes olfactifs, des hémisphères cérébraux ou du cervelet au niveau macroscopique,

— modification des dimensions relatives des diverses régions du cerveau, notamment augmentations ou diminutions de la taille des régions s'expliquant par une perte ou une persistance de populations normalement transitoires de cellules ou de projections axoniques (par exemple couche germinale externe du cervelet, corps calleux),

— modifications de la prolifération, de la migration, et de la différentiation, révélées par des zones d'apoptose ou nécrose excessives, de populations groupées ou dispersées de neurones ectopiques, désorientés ou malformés ou d'altérations des dimensions relatives des diverses couches de structures corticales,

— modifications des modèles de myélinisation, notamment réduction de la taille globale ou modification de la coloration des structures myélinisées,

— signe d'hydrocéphalie, en particulier grossissement des ventricules, sténose de l'aqueduc de Sylvius et amincissement des hémisphères cérébraux.

Analyse de la relation dose-réponse des altérations neuropathologiques

45. Le protocole suivant est recommandé pour les analyses neuropathologiques qualitatives et quantitatives. Il s'agit d'un protocole par étapes. Premièrement, on compare des coupes du groupe de dose la plus élevée avec celles du groupe témoin. En l'absence d'observations d'altérations neuropathologiques chez les animaux du groupe de dose élevée, aucune autre analyse n'est requise. Si des preuves d'altérations neuropathologiques sont notées dans ce groupe, les animaux des groupes de doses intermédiaire et faible sont examinés. Si l'étude sur le groupe de dose élevée est interrompue par le décès ou l'observation d'une toxicité parasite sur les animaux, il faut rechercher dans les groupes de dose élevée et intermédiaire des altérations neuropathologiques. Si l'on détecte des signes de neurotoxicité dans les groupes de doses inférieures, il convient de mener l'analyse neuropathologique dans ces groupes. Pour toute altération neuropathologique liée au traitement, observée lors des examens qualitatifs ou quantitatifs, il faudra déterminer la nature dose-dépendante de l'incidence, de la fréquence et du degré de gravité des lésions ou des altérations morphométriques, en se basant sur une évaluation de tous les animaux de tous les groupes de doses. Toutes les régions du cerveau présentant un signe quelconque d'altération neuropathologique doivent être incluses dans cette évaluation. Il conviendra, pour chaque type de lésion, de décrire les caractéristiques choisies pour définir les différents degrés de gravité, en indiquant les critères employés pour différencier chaque degré. La fréquence de chaque type de lésion et son degré de gravité doivent être enregistrés et une analyse statistique permettra d'évaluer la nature de la relation dose-réponse. L'utilisation de lames codées est recommandée (91).

RÉSULTATS ET RAPPORTS

Résultats

46. Les données doivent être rapportées individuellement et résumées sous forme de tableau, présentant pour chaque groupe d'essai les types de modification et le nombre de mères, de descendants par sexe et de portées présentant chaque type de modification. Dans le cas d'une exposition postnatale des petits, la voie, la durée et la période d'exposition doivent être indiquées.

▼M5

Évaluation et interprétation des résultats

47. L'objectif d'une étude de neurotoxicité développementale est de fournir des informations sur les effets d'une exposition répétée à une substance pendant le développement in utero et postnatal précoce. L'étude est axée tant sur la toxicité générale que sur les effets neurotoxiques sur le développement, et c'est pourquoi les résultats de l'étude devront permettre de distinguer les effets neurodéveloppementaux qui apparaissent en l'absence de toxicité maternelle générale de ceux qui ne sont exprimés qu'à des doses également toxiques pour la mère. La complexité des interrelations entre le modèle de l'étude, l'analyse statistique et la signification biologique des résultats exige l'avis d'un expert pour assurer une interprétation correcte des données de neurotoxicité pour le développement (107) (109). L'interprétation des résultats de l'essai observera une approche basée sur le poids de la preuve (20) (92) (93) (94). Il conviendra de discuter les types d'effets comportementaux ou morphologiques observés, s'ils existent, ainsi que les preuves d'une relation dose-réponse. Cette caractérisation doit inclure les données issues de toutes les études d'évaluation de la neurotoxicité pour le développement, en particulier des études épidémiologiques sur l'homme ou des rapports d'études de cas et des études sur animaux expérimentaux (par exemple données toxicocinétiques, informations sur la relation structure-activité, données issues d'autres études de toxicité). Cela comprend aussi les relations entre les doses de la substance d'essai et la présence ou l'absence, l'incidence et l'ampleur d'effets neurotoxiques, quels qu'ils soient, sur chaque sexe (20) (95).

48. L'évaluation des résultats comprendra une discussion analysant la signification biologique et la signification statistique. L'analyse statistique doit être considérée comme un outil orientant l'interprétation des données sans la déterminer totalement. Une signification statistique ne permet pas de conclure à elle seule, si elle est nulle, à l'absence d'effet lié au traitement, ni, si elle est positive, à un effet lié au traitement. Afin de se prémunir contre l'observation d'éventuels faux négatifs et contre les difficultés inhérentes à la «démonstration d'un résultat négatif», il conviendra d'inclure dans la discussion des données de témoins positifs et historiques, en particulier dans le cas d'absence d'effets liés au traitement (102) (106). La probabilité d'obtention de faux positifs doit faire l'objet d'une analyse dans le cadre de l'évaluation statistique générale des résultats (96). L'évaluation doit inclure, le cas échéant, la relation entre les altérations neuropathologiques et comportementales observées.

49. Tous les résultats devront être analysés en utilisant des modèles statistiques adaptés au protocole expérimental (108). Le choix d'une analyse paramétrique ou non paramétrique doit être justifié en tenant compte de facteurs tels que la nature des données (transformées ou non) et leur distribution, mais aussi de la robustesse relative de l'analyse statistique utilisée. Le choix des analyses statistiques doit être guidé par l'objectif et le modèle de l'étude de façon à limiter autant que possible les erreurs de type I (faux positifs) et de type II (faux négatifs) (96) (97) (104) (105). Si les études sur le développement font appel à des espèces multipares dans lesquelles plusieurs petits par portée sont soumis à l'essai, la portée doit être incluse dans le modèle statistique pour éviter l'accroissement des taux d'erreurs de type I (98) (99) (100) (101). L'unité statistique de la mesure doit alors être la portée et non le petit. Les modèles expérimentaux doivent éviter le traitement d'individus de la même portée dans des observations indépendantes. Des effets mesurés à plusieurs reprises sur le même sujet, quels qu'ils soient, doivent être analysés à l'aide de modèles statistiques qui tiennent compte de la non-indépendance de ces mesures.

Rapport d'essai

50. Le rapport d'essai doit comporter les informations ci-après:

Substance d'essai

— Nature physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques

— Données permettant son identification, notamment source

▼**M5**

— Pureté de la préparation, et impuretés connues et/ou probables

Véhicule (le cas échéant)

— Justification du choix du véhicule, s'il ne s'agit ni d'eau ni d'une solution saline physiologique

Animaux expérimentaux

— Espèces et souches utilisées, et justification si choix d'une autre espèce que le rat

— Fournisseur des animaux expérimentaux

— Nombre, âge au début de l'essai, et sexe des animaux

— Source, conditions d'hébergement, régime alimentaire, eau, etc.

— Poids de chaque animal au début de l'essai

Conditions expérimentales

— Justification du choix des doses

— Justification de la voie et de la période d'administration

— Précisions sur les doses administrées, notamment détails sur le véhicule, le volume et la forme physique de la substance administrée

— Précisions sur la formulation de la substance d'essai et la préparation des aliments, concentration finale, stabilité et homogénéité de la préparation

— Méthode utilisée pour l'identification individuelle des mères et des descendants

— Description détaillée du ou des protocoles de randomisation employés pour affecter les mères aux groupes de traitement, pour sélectionner les petits éliminés de la portée, et affecter les petits aux groupes d'essai

— Précisions sur l'administration de la substance d'essai

— Conversion de la concentration (ppm) de la substance d'essai dans les aliments, l'eau de boisson ou le dispositif d'inhalation en dose réelle (mg/kg de masse corporelle/jour), si possible

— Conditions environnementales

— Précisions sur la qualité des aliments et de l'eau (par exemple eau du robinet, eau distillée)

— Dates de début et de fin de l'étude

Observations et protocoles d'essai

— Description détaillée des protocoles utilisés pour standardiser les observations et les protocoles, avec définitions utilisées pour la notation des observations

— Liste de tous les protocoles d'essai utilisés, et justification de leur choix

— Précisions sur les protocoles d'études comportementales et fonctionnelles, pathologiques, neurochimiques ou électrophysiologiques employés, y compris des informations et des détails sur les appareils automatiques

— Protocoles d'étalonnage et de vérification de l'équivalence des appareils et de répartition équilibrée des groupes de traitement dans les protocoles d'essai

— Brève justification explicitant toutes les décisions impliquant une appréciation professionnelle

▼**M5**

Résultats (individuels et globaux, avec moyenne et variance, le cas échéant)

— Nombre d'animaux au début de l'étude et nombre à la fin de l'étude

— Nombre d'animaux et de portées utilisés pour chaque méthode d'essai

— Numéro d'identification de chaque animal et de la portée à laquelle il appartient

— Effectif de la portée et poids moyen à la naissance par sexe

— Résultats de poids corporel et de variation du poids corporel, y compris poids corporel final pour les mères et les petits

— Données sur la consommation d'aliments et la consommation d'eau, s'il y a lieu (par exemple si la substance d'essai est administrée par l'intermédiaire de l'eau)

— Résultat de réponse toxique par sexe et dose, notamment signes de toxicité ou de mortalité, y compris le moment et la cause du décès, le cas échéant

— Nature, gravité, durée, jour de la survenue, moment de la journée, et évolution ultérieure des observations cliniques détaillées

— Notation de chaque marqueur du développement (poids, maturité sexuelle et ontogénie comportementale) à chaque moment d'observation

— Description détaillée de toutes les observations de comportement, fonctionnelles, neuropathologiques, neurobiologiques, électrophysiologiques par sexe, y compris augmentations et diminutions par rapport au témoin

— Observations à l'autopsie

— Poids des cerveaux

— Tout diagnostic, déduit des signes et des légions neurologiques, y compris les maladies ou les conditions naturelles

— Images des observations représentatives

— Images à faible grossissement permettant d'évaluer l'homologie des coupes utilisées pour la morphométrie

— Données d'absorption et de métabolisme, notamment données complémentaires issues d'une étude toxicocinétique séparée, si elle est disponible

— Traitement statistique des résultats, notamment modèles statistiques employés pour analyser les données, et résultats, qu'ils soient significatifs ou non

— Liste du personnel impliqué dans l'étude, mentionnant leur formation professionnelle

Discussion des résultats

— Information sur la relation dose-réponse, par sexe et groupe

— Lien entre chaque effet toxique et la conclusion proposée sur le potentiel neurotoxique de la substance d'essai, par sexe et groupe

— Répercussions de toutes les informations toxicocinétiques sur les conclusions

— Similitudes des effets observés avec ceux de tous les neurotoxiques connus

▼M5

— Données démontrant la fiabilité et la sensibilité de la méthode de l'essai (c'est-à-dire résultats des témoins positifs et historiques)

— Relations éventuelles entre les effets neuropathologiques et fonctionnels

— CSENO ou dose de référence pour les mères et les petits, par sexe et groupe

Conclusions

— Discussion sur l'interprétation générale fondée sur les résultats, incluant une conclusion indiquant si la substance chimique d'essai est responsable ou non d'une neurotoxicité pour le développement, et indiquant la CSENO

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (1995), Draft Report of the OECD Ad Hoc Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity, Copenhague, Danemark, 13-14 juin 1995.

(2) US EPA (1998), Lignes directrices d'essai de l'Agence des États-Unis pour la protection de l'environnement, OPPTS 870.6300, Developmental Neurotoxicity Study, US EPA 712-C-98-239, disponible à l'adresse suivante: http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/

(3) US EPA (1998), Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment, US EPA 630/R-95/001F, disponible à l'adresse suivante: http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479

(4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., et Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects, Environ. Health Perspect., 109:79-91.

(5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., et Mileson, B.E. (2001), Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations, Environ. Health Perspect., 109:101-111.

(6) Garman, R.H., Fix, A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001), Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology, Environ. Health Perspect., 109:93-100.

(7) OCDE (2003), Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing, Washington DC, US, 23-25 octobre 2000.

(8) OCDE (2008), OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, n° 43, Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment, direction de l'environnement, OCDE, Paris, juillet 2008, disponible à l'adresse suivante: http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(200816&doclanguage=en)

(9) OCDE (2003), OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, No. 20, Guidance Document for Neurotoxicity Testing, Direction de l'environnement, OCDE, Paris, septembre 2003, disponible à l'adresse suivante: http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html

(10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990), Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity, Neurotoxicol. Teratol., 12: 173-292.

(11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000), Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition, ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.

▼M5

(12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002), Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits, Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 8:188-197.

(13) Slikker, W.B., et Chang, L.W. (1998) Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1st Edition, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

(14) Chapitre B.34 de la présente annexe, «Étude de toxicité pour la reproduction sur une génération».

(15) Chapitre B.35 de la présente annexe, «Étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations».

(16) Chapitre B.43 de la présente annexe, «Étude de neurotoxicité chez les rongeurs».

(17) Chapitre B.31 de la présente annexe, «Étude de la toxicité pour le développement prénatal».

(18) Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (JO L 276 du 20.10.2010, p. 33).

(19) OMS (1986), Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: Centre des publications de l'Organisation mondiale de la santé, USA, disponible à l'adresse suivante: http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm

(20) OMS (2001), Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches (Environmental Health Criteria 223), publications de l'Organisation mondiale de la santé, Genève, disponible à l'adresse suivante: http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm

(21) Chang, L.W., et Slikker, W. (1995), Neurotoxicology: Approaches and Methods, 1st Edition, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.

(22) De Cabo, C., et Viveros, M.P. (1997), Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders, Neurotoxicol. Teratol., 19:499-509.

(23) Agnish, N.D., et Keller, K.A. (1997), The rationale for culling of rodent litters, Fundam. Appl. Toxicol., 38:2-6.

(24) Avery, D.L., et Spyker, J.M. (1977), Foot tattoo of neonatal mice, Lab. Animal Sci., 27:110-112.

(25) Wier, P.J., Guerriero, et F.J., Walker, R.F. (1989), Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity, Fundam. Appl. Toxicol., 13:118-136.

(26) Spear, N.E., et Campbell, B.A. (1979), Ontogeny of Learning and Memory, ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.

(27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., et Smotherman, W. (1987), Perinatal Development: A Psychobiological Perspective, Academic Press, Orlando.

(28) Zoetis, T., et Walls, I. (2003), Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research, ILSI Press, Washington DC.

(29) Moser, V., Walls, I., et Zoetis, T. (2005), Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group, Int. J. Toxicol., 24:87-94.

(30) Conolly, R.B., Beck, B.D., et Goodman, J.I. (1999), Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment, Toxicol. Sci., 49: 1-4.

(31) ICH (1993), ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Phamaceuticals for Human Use.

(32) Lochry, E.A. (1987), Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations, J. Am. Coll. Toxicol., 6:433-439.

▼M5

(33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., et Tanimura, T. (1998), Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan, Neurotoxicol. Teratol., 20:449-457.

(34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., et Reynolds, V.L. (1999), Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights, Reprod. Toxicol., 13:383-390.

(35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., et Parks, L. (2000), Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat, Toxicol. Sci., 58:350-365.

(36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., et Nelson, B.K. (1985), Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure, Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:579-586.

(37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., et Weiner, R.W. (1977), Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat, Biol. Reprod., 17:298-303.

(38) Spear, L.P. (1990), Neurobehavioral assessment during the early postnatal period, Neurotoxicol. Teratol., 12:489-95.

(39) Altman, J., et Sudarshan, K. (1975), Postnatal development of locomotion in the laboratory rat, Anim. Behav., 23:896-920.

(40) Adams, J. (1986), Methods in Behavioral Teratology, in Handbook of Behavioral Teratology, Riley, E.P., et Vorhees, C.V. (eds) Plenum Press, New York, p. 67-100.

(41) Reiter, L.W., et MacPhail, R.C. (1979), Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing, Neurobehav. Toxicol., 1:53-66.

(42) Robbins, T.W. (1977), A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, Handbook of Psychopharmacology, vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., et Snyder, S.H., (eds), Plenum Press, New York, p. 37-82.

(43) Crofton, K.M., Peele, D.B., et Stanton, M.E. (1993), Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat, Neurotoxicol. Teratol., 15:117-129.

(44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., et Reiter, L.W. (1985), Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes, Dev. Psychobiol., 18:247-260.

(45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., et MacPhail, R.C. (1991), Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments, Neurotoxicol. Teratol., 13:599-609.

(46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., et Carr, G. J. (1997), Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats, Neurotoxicol. Teratol., 19:1997. 405-411.

(47) Handley, D.E., Ross, J.F., et Carr, G.J. (1998), A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals, Physiol. Behav., 64:661-669.

(48) Edwards, P.M., et Parker, V.H. (1977), A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats, Toxicol. Appl. Pharmacol., 40:589-591.

(49) Davis, M. (1984), The mammalian startle response, in Neural Mechanisms of Startle Behavior, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, p. 287-351.

(50) Koch, M. (1999), The neurobiology of startle, Prog. Neurobiol., 59:107-128.

(51) Crofton, K.M. (1992), Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction, in Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology, Tilson, H., et Mitchell, C. (eds), Raven Press, New York, p. 181-211.

▼**M5**

(52) Crofton, K.M., et Sheets, L.P. (1989), Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response, J. Am. Coll. Toxicol., 8:199-211.

(53) Crofton, K.M, Lassiter, T.L, et Rebert, C.S. (1994), Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit, Hear, Res., 80:25-30.

(54) Ison, J.R. (1984), Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure, Neurobehav. Toxicol. Teratol., 6:437–445.

(55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., et Ross, J.F. (1992), Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes, in Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity, Tilson, H., et Mitchell, C., (eds), Raven Press, New York, p. 125-145.

(56) Peele, D.B., Allison, S.D., et Crofton, K.M. (1990), Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile, Toxicol. Appl. Pharmacol., 105:321-332.

(57) Bammer, G. (1982), Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results, Neurosci. Behav. Rev., 6:247-296.

(58) Bushnell, P.J. (1988), Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats, Neurotoxicol. Teratol., 10:237-244.

(59) Green, R.J., et Stanton, M.E. (1989), Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat, Behav. Neurosci., 103:98-105.

(60) Kucharski, D., et Spear, N.E. (1984), Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat, Develop. Psychobiol., 17:465-479.

(61) Morris, R. (1984), Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat, J. Neurosci. Methods, 11:47-60.

(62) Brandeis, R., Brandys, Y., et Yehuda, S. (1989), The use of the Morris water maze in the study of memory and learning, Int. J. Neurosci., 48:29-69.

(63) D'Hooge, R., et De Deyn, P.P. (2001), Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory, Brain Res. Rev, 36:60-90.

(64) Vorhees, C.V. (1987), Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin, Neurotoxicol. Teratol., 9:235-241.

(65) Vorhees, C.V. (1997), Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins, Drug Chem. Toxicol., 20:387-399.

(66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., et Sakaguchi, T. (1988), Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly, Neurotoxicol. Teratol., 10:327-332.

(67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., et Cox, C. (1983), Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration, Toxicol. Appl. Pharmacol., 71:342-352.

(68) Campbell, B.A., et Haroutunian, V. (1981), Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding, J. Gerontol., 36:338–341.

(69) Fix, A.S, et Garman, R.H. (2000), Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system, Toxicol. Pathol., 28: 122-131.

(70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., et Sobin, L.H. (1994) Laboratory Methods in Histotechnology, American Registry of Pathology, Washington DC, p. 84-107.

(71) Bancroft, J.D., et Gamble, M. (2002), Theory and Practice of Histological Techniques, 5th edition, Churchill Livingstone, London.

▼M5

(72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., et Switzer, R.C. (1996), Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex, Toxicol. Pathol., 24: 291-304.

(73) Schmued, L.C., et Hopkins, K.J. (2000), Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration, Brain Res., 874:123-130.

(74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., et Wurmlin, C.H. (2001), Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain, Exp. Toxic. Pathol., 53:365-372.

(75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., et de Olmos de Lorenzo, S. (1994), Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semi-acute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma, Neurotoxicol. Teratol., 16, 545-561.

(76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., et Gundersen, H.J. (2005a), Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives, Environ. Toxicol. Pharmacol., 19:745-755.

(77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., et Gundersen, H.J. (2005b), 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity, Reprod. Toxicol., 20:417-432.

(78) Rodier, P.M., et Gramann, W.J. (1979), Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period, Neurobehav. Toxicol., 1:129–135.

(79) Howard, C.V., et Reed, M.G. (1998), Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy, Springer-Verlag, New York.

(80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998), Stereology: A practical primer for neuropathology, J. Neuropathol. Exp. Neurol., 57:305-310.

(81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., et Møller, A. (1993), Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method, Brain Res., 609:262-268.

(82) Schmitz, C. (1997), Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology, J. Neurocytol., 26:707-710.

(83) West, M.J. (1999), Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias, Trends Neurosci., 22:51-61.

(84) Schmitz, C., et Hof, P.R. (2005), Design-based stereology in neuroscience, Neuroscience, 130:813-831.

(85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., et Rodier, P.M. (1994), Patterns of growth deficiency in rats exposed in utero to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM), Teratology, 49:113-121.

(86) Ohno, M., Aotani, H., et Shimada, M. (1995), Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum, Develop. Brain Res., 84:294-298.

(87) Jensen KF, et Catalano SM. (1998), Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology, in Handbook of Developmental Neurotoxicology, Slikker, Jr. W., et Chang, L.W. (eds), Academic Press, New York, p. 3-41.

(88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovska, V., Turski, L., et Olney, J.W. (1999), Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain, Science, 283:70-74.

▼M5

(89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., et Olney, J.W. (2000), Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome, Science, 287:1056–1060.

(90) Friede, R. L. (1989), Developmental Neuropathology, 2nd edition, Springer-Verlag, Berlin.

(91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., et Simmons, J.E. (1992), Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions, Toxicol. Let., 63:127-133.

(92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., et Crofton, K.M. (1996), Setting exposure standards: a decision process, Environ. Health Perspect., 104:401-405.

(93) US EPA (2005), Guidelines for Carcinogen Risk Assessment, US EPA NCEA-F-0644A.

(94) US EPA (1996), Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register, 61(212): 56274-56322.

(95) Danish Environmental Protection Agency (1995), Neurotoxicology, Review of Definitions, Methodology and Criteria, Miljøprojekt nr. 282, Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., et Arlien-Søborg, P.

(96) Muller, K.E., Barton, C.N., et Benignus, V.A. (1984), Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments, Neurotoxicology, 5:113-126.

(97) Gad, S.C. (1989), Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology, J. Am. Coll. Toxicol., 8:21-27.

(98) Abby, H., et Howard, E. (1973), Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring, Dev. Psychobiol., 6:329-335.

(99) Haseman, J.K., et Hogan, M.D. (1975), Selection of the experimental unit in teratology studies, Teratology, 12:165-172.

(100) Holson, R.R., et Pearce, B. (1992), Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species, Neurotoxicol. Teratol., 14:221-228.

(101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., et Adams, J. (1985), Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach, Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:587-90.

(102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., et Raffaele, K.C. (2004), A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies, Neurotoxicol. Teratol., 26:345-352.

(103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an ad hoc working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing — for today, Toxicol. Pathol., 34:296-313.

(104) Tamura, R.N., et Buelke-Sam, J. (1992), The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies, Neurotoxicol. Teratol., 14(3):205-210.

(105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., et Heyse, J.F. (1985), Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug, Biometrics, 41:295-301.

(106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., et Parker, S.P. (2008), Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints, Neurotoxicology and Teratology, 30(4):266-287.

(107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., et Sobrian, S.K. (2008), Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints, Neurotoxicology and Teratology, 30(4):288-325.

▼**M5**

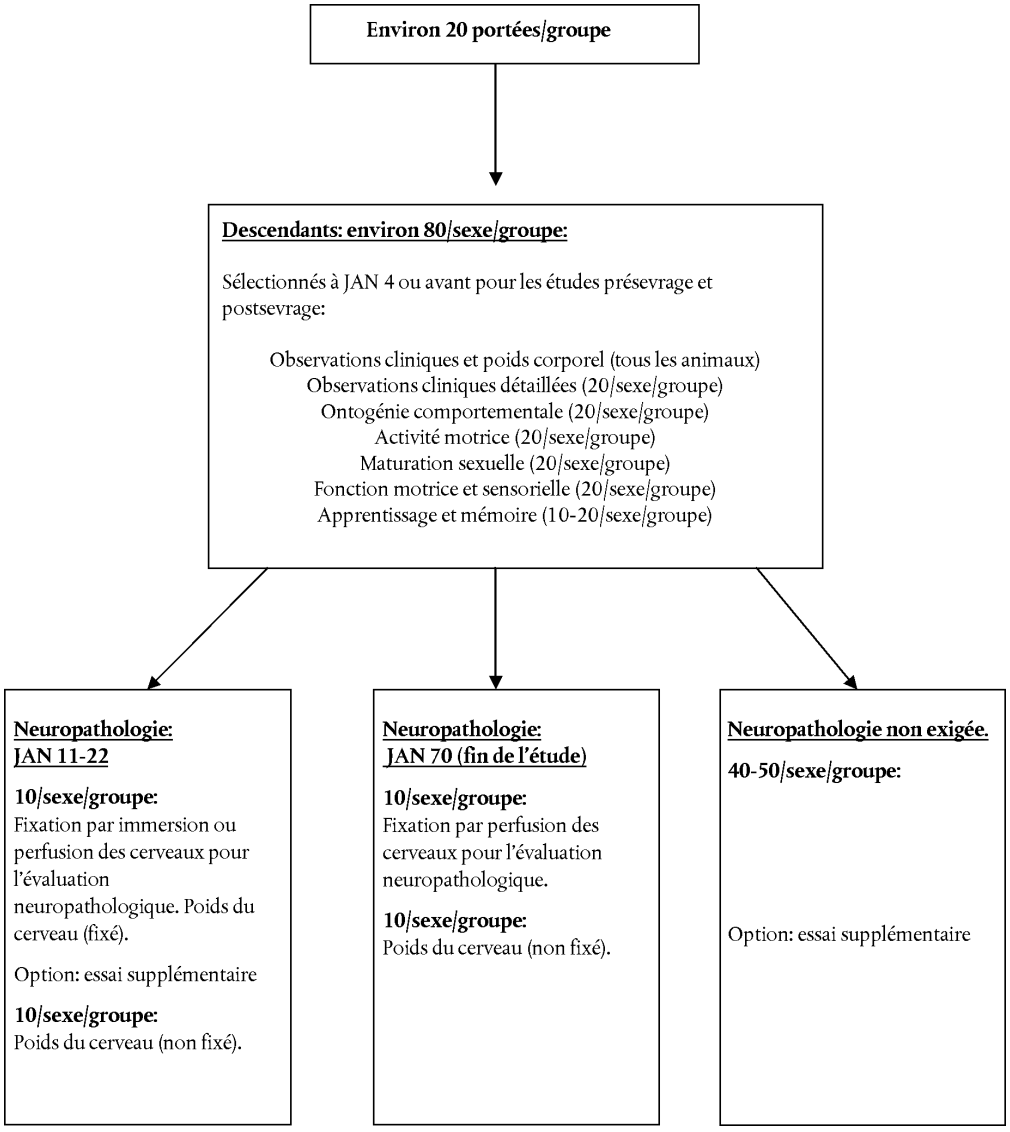
(108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., et Phang, W. (2008), Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints, Neurotoxicology and Teratology, 30(4):326-348.

(109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., et Sobotka, T.J. (2008), Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints, Neurotoxicology and Teratology, 30(4):349-381.

▼**M5**

Figure 1

Schéma général des essais fonctionnels et comportementaux, de l'évaluation neuropathologique et de la mesure des poids des cerveaux. Ce diagramme s'appuie sur la description présentée dans les paragraphes 13-15 (JAN = jour après la naissance). Des exemples de répartition des animaux sont donnés dans l'appendice 1



▼**M5**

Appendice 1

1. Des exemples de répartitions possibles sont décrits et présentés ci-dessous sous forme de tableaux. Ils sont fournis à titre d'illustration afin de démontrer que l'affectation des animaux de l'étude à divers paradigmes de l'essai peut s'effectuer selon plusieurs modes différents.

Exemple 1

2. Un groupe de 20 petits/sexe/dose (1 mâle et 1 femelle par portée) est utilisé pour l'essai avant sevrage de l'ontogénie du comportement. Parmi ces animaux, dix petits/sexe/dose (1 mâle ou 1 femelle par portée) sont humainement sacrifiés à JAN 22. Les cerveaux sont prélevés, pesés et soumis à un traitement de préparation pour une évaluation histopathologique. De surcroît, les résultats pondéraux concernant le cerveau sont recueillis sur des cerveaux non fixés appartenant aux 10 mâles et aux 10 femelles restants par dose.

3. On utilise un autre groupe de 20 animaux/sexe/dose (1 mâle et 1 femelle par portée) pour les essais fonctionnels et comportementaux postsevrage (observation clinique détaillée, activité motrice, sursauts auditifs et essais de la fonction cognitive chez les adolescents) et l'évaluation de l'âge de maturité sexuelle. Dix animaux/sexe/dose (1 mâle ou 1 femelle par portée) de ce groupe sont anesthésiés et fixés par perfusion à la fin de l'étude (environ JAN 70). Après une nouvelle fixation in situ, le cerveau est prélevé et traité à des fins d'évaluation neuropathologique.

4. L'analyse de la fonction cognitive chez les jeunes adultes (par exemple JAN 60-70) implique un troisième groupe de 20 petits/sexe/niveau de dose (1 mâle et 1 femelle par portée). Dix animaux/sexe/groupe (1 mâle ou 1 femelle par portée) sont sacrifiés à la fin de l'étude et leur cerveau est prélevé et pesé.

5. Les 20 autres animaux/sexe/groupe sont réservés à d'autres essais éventuels.

Tableau 1

Petit n° [a]		Nombre de petits affectés à l'essai	Examen/Essai
m	f		
1	5	20 m + 20 f	Ontogénie du comportement
		10 m + 10 f	Poids du cerveau/neuropathologie/morphométrie à JAN 22
		10 m + 10 f	Poids du cerveau à JAN 22
2	6	20 m + 20 f	Observations cliniques détaillées
		20 m + 20 f	Activité motrice
		20 m + 20 f	Maturité sexuelle
		20 m + 20 f	Fonction motrice et sensorielle
		20 m + 20 f	Apprentissage et mémoire (JAN 25)
		10 m + 10 f	Poids du cerveau du jeune adulte/neuropathologie/ morphométrie ~JAN 70

▼**M5**

Petit n° (a)		Nombre de petits affectés à l'essai	Examen/Essai
m	f		
3	7	20 m + 20 f	Apprentissage et mémoire (jeunes adultes)
		10 m + 10 f	Poids du cerveau du jeune adulte ~JAN 70
4	8	—	Animaux en réserve pour les remplacements ou d'autres essais

(a) Dans cet exemple, les portées ont été restreintes à 4 mâles + 4 femelles; les petits mâles sont numérotés de 1 à 4 et les petites femelles de 5 à 8.

Exemple 2

6. Un groupe de 20 petits/sexe/niveau de dose (1 mâle et 1 femelle par portée) est utilisé pour l'essai avant sevrage de l'ontogénie du comportement. Dix petits/sexe/dose (1 mâle ou 1 femelle par portée) sont humainement sacrifiés parmi ces animaux à JAN 11. Les cerveaux sont prélevés, pesés et soumis à un traitement de préparation pour une évaluation histopathologique.

7. On utilise un autre groupe de 20 animaux/sexe/dose (1 mâle et 1 femelle par portée) pour les examens fonctionnels et comportementaux postsevrage (observations cliniques détaillées, activité motrice, évaluation de l'âge de maturité sexuelle, fonction motrice et sensorielle). Parmi ces animaux, 10 petits/sexe/dose (1 mâle ou 1 femelle par portée) sont anesthésiés et fixés par perfusion à la fin de l'étude (environ JAN 70). Après une nouvelle fixation in situ, le cerveau est prélevé et traité à des fins d'évaluation neuropathologique.

8. L'analyse de la fonction cognitive chez les jeunes adultes (par exemple JAN 60-70) implique 10 petits/sexe/niveau de dose (1 mâle et 1 femelle par portée). Des animaux différents sont utilisés pour les tests de fonction cognitive à JAN 23 et à l'âge jeune adulte. À la fin de l'étude, 10 animaux/sexe/groupe ayant été soumis aux essais sur adultes sont sacrifiés et leur cerveau est prélevé et pesé.

9. Les 20 autres animaux/sexe/groupe non sélectionnés pour les essais sont sacrifiés et éliminés au sevrage.

Tableau 2

Petit n° (a)		Nombre de petits affectés à l'essai	Examen/Essai
m	f		
1	5	20 m + 20 f	Ontologie du comportement
		10 m + 10 f	Poids du cerveau/neuropathologie/morphométrie à JAN 11
2	6	20 m + 20 f	Observations cliniques détaillées
		20 m + 20 f	Activité motrice
		20 m + 20 f	Maturité sexuelle
		20 m + 20 f	Fonction motrice et sensorielle
		10 m + 10 f	Poids du cerveau du jeune adulte/neuropathologie/morphométrie ~JAN 70

▼**M5**

Petit n° (a)		Nombre de petits affectés à l'essai	Examen/Essai
m	f		
3	7	10 m + 10 f (b)	Apprentissage et mémoire (JAN 23)
3	7	10 m + 10 f (b)	Apprentissage et mémoire (jeunes adultes) Poids du cerveau du jeune adulte
4	8	—	Animaux sacrifiés et éliminés JAN 21

(a) Dans cet exemple, les portées ont été restreintes à 4 mâles + 4 femelles; les petits mâles sont numérotés de 1 à 4 et les petites femelles de 5 à 8.
(b) Des petits différents sont utilisés pour les tests cognitifs à JAN 23 et chez les jeunes adultes (par exemple petits surnuméraires à l'effectif de 20).

Exemple 3

10. Un groupe de 20 petits/sexe/niveau de dose (1 mâle et 1 femelle par portée) est utilisé pour la pesée du cerveau et l'évaluation neuropathologique à JAN 11. Dix petits/sexe/dose (1 mâle ou 1 femelle par portée) sont humainement sacrifiés à JAN 11 dans ce groupe et le cerveau est prélevé, pesé et traité à des fins d'évaluation histopathologique. En outre, des données pondérales sur le cerveau sont recueillies sur des cerveaux non fixés prélevés sur les 10 mâles et les 10 femelles restants par dose.

11. Un autre groupe de 20 animaux/sexe/dose (1 mâle et 1 femelle par portée) est utilisé pour des examens d'ontogénie du comportement (activité motrice), postsevrage (activité motrice et évaluation de l'âge de la maturité sexuelle) et une analyse de la fonction cognitive chez les adolescents.

12. Un autre groupe de 20 animaux/sexe/dose (1 mâle et 1 femelle par portée) est destiné à des essais de fonction motrice et sensorielle (sursaut auditif) et à des observations cliniques détaillées. Dix animaux/sexe/dose (1 mâle ou 1 femelle par portée) de ce groupe sont anesthésiés et fixés par perfusion à la fin de l'étude (environ JAN 70). Après une nouvelle fixation in situ, le cerveau est prélevé, pesé et traité à des fins d'évaluation neuropathologique.

13. Un autre groupe de 20 petits/sexe/dose est utilisé pour l'analyse de la fonction cognitive chez les jeunes adultes (1 mâle et 1 femelle par portée). Parmi ceux-ci, 10 animaux/sexe/groupe (1 mâle ou 1 femelle par portée) sont sacrifiés à la fin de l'étude et leur cerveau est prélevé et pesé.

Tableau 3

Petit n° (a)		Nombre de petits affectés à l'essai	Examen/Essai
m	f		
1	5	10 m + 10 f	Poids du cerveau/neuropathologie/morphométrie à JAN 11
		10 m + 10 f	Poids du cerveau à JAN 11
2	6	20 m + 20 f	Ontogénie du comportement (activité motrice)
		20 m + 20 f	Activité motrice
		20 m + 20 f	Maturité sexuelle
		20 m + 20 f	Apprentissage et mémoire (JAN 27)

▼**M5**

Petit n° (a)		Nombre de petits affectés à l'essai	Examen/Essai
m	f		
3	7	20 m + 20 f	Sursaut auditif (adolescents et jeunes adultes)
		20 m + 20 f	Observations cliniques détaillées
		10 m + 10 f	Poids du cerveau du jeune adulte/neuropathologie/ morphométrie ~JAN 70
4	8	20 m + 20 f	Apprentissage et mémoire (jeunes adultes)
		10 m + 10 f	Poids du cerveau du jeune adulte

(a) Pour cet exemple, les portées sont restreintes à 4 mâles + 4 femelles; les petits mâles sont numérotés de 1 à 4 et les petites femelles de 5 à 8.

▼**M5**

Appendice 2

Définitions

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼M5

B.54. BIOESSAI UTÉROTROPHIQUE CHEZ LES RONGEURS: ESSAI DE DÉPISTAGE À COURT TERME DES PROPRIÉTÉS ŒSTROGÉNIQUES

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice pour les essais de produits chimiques n° 440 (2007) de l'OCDE. L'OCDE a lancé, en 1998, une activité à caractère hautement prioritaire destinée à réviser les lignes directrices existantes et à établir une nouvelle ligne directrice concernant le dépistage des substances susceptibles d'avoir des effets perturbateurs sur le système endocrinien (1). L'un des éléments de cette activité a été de développer une ligne directrice relative au bioessai utérotrophique chez le rongeur. Le bioessai utérotrophique chez le rongeur a donc fait l'objet d'un programme de validation très complet comprenant l'établissement d'un document de référence détaillé (2) (3) et la conduite d'études intra- et interlaboratoires très complètes, destinées à montrer la pertinence et la reproductibilité du bioessai réalisé avec un puissant œstrogène de référence, des agonistes faibles des récepteurs œstrogéniques, un puissant antagoniste des récepteurs œstrogéniques, et une substance chimique de référence négative (4) (5) (6) (7) (8) (9). La présente méthode d'essai B.54 a été établie à la lumière de l'expérience acquise durant le programme de validation de l'essai et des résultats obtenus concernant les agonistes des œstrogènes.

2. Le bioessai utérotrophique est un essai de dépistage à court terme qui remonte aux années 30 (27) (28) et qui a été normalisé pour la première fois en 1962 aux fins du dépistage par une commission d'experts (32) (35). Cet essai se fonde sur l'augmentation du poids utérin, encore appelée réponse utérotrophique (voir 29). Il évalue la capacité d'une substance chimique à provoquer une activité biologique analogue à celle des agonistes ou antagonistes des œstrogènes naturels (17ß-estradiol par exemple), mais il est toutefois beaucoup plus rarement utilisé pour la détection d'antagonistes que d'agonistes. L'utérus réagit aux œstrogènes de deux façons. La réponse initiale est un accroissement pondéral dû à l'absorption d'eau. Cette réaction est suivie par une augmentation du poids due à la croissance tissulaire (30). La réaction de l'utérus chez le rat et la souris est qualitativement comparable.

3. Ce bioessai sert de test de dépistage in vivo et son application doit être envisagée dans le contexte du «Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens» (appendice 2). Dans ce cadre conceptuel, le bioessai utérotrophique intervient au niveau 3 en tant qu'essai in vivo fournissant des données sur un seul mécanisme endocrinien, à savoir le pouvoir œstrogénique.

4. Le bioessai utérotrophique est censé faire partie d'une batterie d'essais in vitro et in vivo destinés à identifier les substances susceptibles d'agir sur le système endocrinien, pour permettre à terme d'évaluer les risques pour la santé humaine ou l'environnement. Le programme de validation de l'OCDE a utilisé des agonistes œstrogéniques puissants et faibles pour évaluer l'aptitude de l'essai à identifier les composés œstrogéniques (4) (5) (6) (7) (8). La sensibilité de la procédure d'essai aux agonistes œstrogéniques a pu ainsi être démontrée, de même que sa bonne reproductibilité intra- et interlaboratoire.

5. En ce qui concerne les substances chimiques négatives, seule une substance chimique de référence «négative» déjà identifiée comme telle par l'essai utérotrophique et les essais in vitro de liaison avec les récepteurs a été incluse dans le programme de validation, mais des données complémentaires, extérieures au programme de validation de l'OCDE, ont été évaluées, et ont confirmé la spécificité du bioessai utérotrophique pour le dépistage d'agonistes des œstrogènes (16).

▼**M5**

CONSIDÉRATIONS INITIALES ET LIMITATIONS

6. Les agonistes et antagonistes des œstrogènes agissent comme ligands des récepteurs œstrogéniques α et β et peuvent respectivement activer ou inhiber l'activité transcriptionnelle des récepteurs. Cela peut avoir des conséquences négatives pour la santé, notamment des effets sur la reproduction et le développement. Il est donc nécessaire d'évaluer rapidement les substances chimiques pour déterminer leur éventuelle activité agoniste ou antagoniste des œstrogènes. Bien qu'instructive, l'affinité d'un ligand et d'un récepteur œstrogénique ou l'activation transcriptionnelle des gènes rapporteurs in vitro ne représente qu'un déterminant, parmi plusieurs, d'un danger possible. Les autres facteurs déterminants peuvent être l'activation et la désactivation métaboliques lors de l'entrée dans l'organisme, la distribution entre les tissus cibles et l'élimination de l'organisme, qui dépendent, au moins en partie, de la voie d'administration et de la substance d'essai. Il est par conséquent nécessaire de dépister l'activité éventuelle d'une substance chimique in vivo dans des conditions appropriées, sauf si les caractéristiques ADME (absorption, distribution, métabolisme, élimination) de la substance chimique fournissent déjà les informations indispensables. Les tissus utérins réagissent aux œstrogènes par une croissance rapide et vigoureuse, notamment chez les rongeurs de laboratoire, dont le cycle œstral dure environ 4 jours. Les rongeurs, en particulier le rat, sont aussi largement utilisés dans les études de toxicité pour caractériser les dangers. En conséquence, l'utérus des rongeurs est un organe cible approprié pour le dépistage in vivo des agonistes et antagonistes des œstrogènes.

7. La présente méthode d'essai s'appuie sur les protocoles employés dans l'étude de validation de l'OCDE qui se sont révélés fiables et reproductibles dans les études intra- et interlaboratoires (5) (7). À l'heure actuelle deux méthodes sont disponibles, l'une utilisant des femelles adultes ovariectomisées (méthode adulte-ovx) et l'autre, des animaux immatures, non ovariectomisés (méthode immature). Le programme de validation des essais de l'OCDE a montré que la sensibilité et la reproductibilité de ces deux méthodes étaient comparables. Cependant, la méthode sur des femelles immatures, dont l'axe hypothalamo-pituito-gonadique (HPG) est intact, est peut-être moins spécifique mais couvre un plus large champ d'investigation que celle pratiquée sur des animaux ovariectomisés, parce qu'elle est sensible à des substances qui interagissent avec l'axe HPG et non pas uniquement avec les récepteurs aux œstrogènes. L'axe HPG de la rate est fonctionnel à partir d'environ 15 jours après la naissance. Avant cet âge, la puberté ne peut pas être accélérée par des traitements comme la GnRH. À l'approche de la puberté, avant l'ouverture du vagin, la femelle a plusieurs cycles silencieux sans ouverture vaginale ni ovulation, mais qui se manifestent par certaines fluctuations hormonales. Si une substance chimique stimule l'axe HPG directement ou indirectement durant cette période, on assiste à une puberté précoce, une ovulation précoce ou une ouverture vaginale accélérée. Les substances chimiques agissant sur l'axe HPG produiront cet effet, mais également certains régimes à niveaux d'énergie métabolisable plus élevés que les autres stimuleront la croissance et accéléreront l'ouverture vaginale sans être œstrogéniques. Ces substances n'induiront pas de réponse utérotrophique chez les animaux adultes ovariectomisés puisque leur axe HPG ne fonctionne pas.

8. Dans un souci de protection des animaux, on privilégiera la méthode pratiquée sur des rates immatures pour éviter le prétraitement chirurgical des animaux et le risque de ne pas pouvoir utiliser les animaux manifestant des signes de préœstrus (voir le paragraphe 30).

▼**M5**

9. La réponse utérotrophique n'est pas entièrement d'origine œstrogénique, d'autres substances chimiques que les agonistes ou antagonistes des œstrogènes peuvent aussi intervenir. Par exemple, des doses relativement élevées de progestérone, de testostérone ou de diverses progestines synthétiques peuvent aussi induire une stimulation (30). Toutes les réactions peuvent faire l'objet d'une analyse histologique indiquant une kératinisation et une cornification du vagin (30). Indépendamment de l'origine possible de la réponse, tout bioessai utérotrophique positif doit normalement donner lieu à des recherches plus poussées, permettant d'apporter des clarifications. Le pouvoir œstrogénique peut être confirmé par des essais in vitro, notamment par des essais de liaison avec les récepteurs ER et des essais d'activation transcriptionnelle, ou par d'autres essais in vivo, notamment l'essai de puberté chez les femelles.

10. Sachant que le bioessai utérotrophique sert d'essai de dépistage in vivo, la méthode de validation adoptée a pris en compte le bien-être des animaux et retenu une stratégie d'essai par étapes. À cette fin, des efforts ont été déployés pour valider de façon rigoureuse la reproductibilité et la sensibilité du dépistage du pouvoir œstrogénique (problème majeur pour beaucoup de substances chimiques), mais peu de travaux ont été consacrés à la composante antiœstrogénique de l'essai. Un seul antiœstrogène, puissant, a été testé, étant donné que le nombre de substances chimiques possédant un profil clairement antiœstrogénique (qui ne soit pas masqué par une activité œstrogénique) est très limité. En conséquence, la présente méthode d'essai est dédiée au protocole œstrogénique, tandis que le protocole décrivant le mode antagoniste de l'essai figure dans un document d'orientation (37). La reproductibilité et la sensibilité de l'essai pour les substances chimiques ayant une activité purement antiœstrogénique seront mieux définies ultérieurement, lorsque la procédure d'essai aura été utilisée de façon routinière pendant assez longtemps et que davantage de substances présentant ce mode d'action auront été identifiées.

11. Il est reconnu que toutes les procédures faisant appel à des animaux respecteront les normes locales en matière de bien-être animal; les descriptifs des soins et traitements figurant ci-après constituent donc des normes minimales auxquelles se substitueront les réglementations locales telles que la directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (38). D'autres orientations relatives au traitement humain des animaux ont été formulées par l'OCDE (25).

12. Comme dans tous les essais faisant appel à des animaux vivants, il est indispensable de s'assurer que les données sont réellement nécessaires avant de commencer l'essai. À titre d'exemple, des données peuvent être réellement nécessaires dans les deux situations suivantes:

— risque d'exposition élevé (niveau 1 du Cadre conceptuel, appendice 2 du présent chapitre) ou éléments indiquant un pouvoir œstrogénique (niveau 2), d'où nécessité d'étudier si ces effets peuvent se produire in vivo,

— effets témoignant d'un pouvoir œstrogénique aux niveaux 4 et 5 dans les essais in vivo, d'où nécessité de démontrer que les effets sont liés à un mécanisme œstrogénique qui ne peut être mis en évidence dans les essais in vitro.

13. La définition des termes utilisés dans la présente méthode d'essai figure à l'appendice 1.

▼**M5**

PRINCIPE DE L'ESSAI

14. La sensibilité du bioessai utérotrophique exige un dispositif d'essai dans lequel l'axe hypothalamo-pituito-ovarien n'est pas fonctionnel, d'où de faibles niveaux d'œstrogènes endogènes en circulation. Cela garantira un poids utérin de référence peu élevé et le plus large éventail possible de réponses aux œstrogènes administrés. Les rongeurs femelles remplissent ces conditions dans deux cas:

i) femelles immatures, après sevrage et avant la puberté;

ii) jeunes femelles adultes ovariectomisées, passé le délai nécessaire à la régression des tissus utérins

15. La substance d'essai est administrée chaque jour par gavage oral ou injection sous-cutanée. Des doses modulées de la substance d'essai sont administrées à au moins deux groupes d'animaux (pour plus de précisions voir le paragraphe 33); on applique un niveau de dose par groupe; la période d'administration est de 3 jours consécutifs dans la méthode sur femelles immatures et d'au minimum 3 jours consécutifs dans la méthode sur femelles adultes ovariectomisées. Les animaux sont sacrifiés environ 24 heures après l'administration de la dernière dose. Pour dépister les agonistes des œstrogènes, on mesure le rapport entre le poids utérin moyen des animaux des groupes d'essai et celui des animaux du groupe témoin qui a reçu le véhicule pour déterminer s'il existe une augmentation statistiquement significative. Une augmentation statistiquement significative du poids utérin moyen d'un groupe d'essai indique une réponse positive à ce bioessai.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Sélection de l'espèce animale

16. Les souches de rongeurs utilisées communément en laboratoire peuvent convenir. Par exemple, les souches de rats Sprague-Dawley et Wistar ont été utilisées pour la validation. Il conviendra de ne pas utiliser les souches pour lesquelles on sait ou on suspecte que l'utérus est moins réactif. Le laboratoire doit démontrer la sensibilité de la souche utilisée comme indiqué aux paragraphes 26 et 27.

17. Depuis les années 30, le rat et la souris sont utilisés de façon routinière pour le bioessai utérotrophique. Les études de validation de l'OCDE ont été effectuées seulement sur des rats, étant entendu que ces deux espèces sont en principe équivalentes et qu'une seule devrait suffire pour la validation mondiale, l'idée étant d'économiser les ressources et de préserver les animaux. L'espèce retenue pour la plupart des études de toxicité pour la reproduction et le développement est le rat. Sachant qu'on dispose d'une riche base de données rétrospectives concernant la souris et, pour élargir le champ d'application de la méthode d'essai relative au bioessai utérotrophique chez les rongeurs, une étude de validation complémentaire limitée a été effectuée sur la souris (16). On a adopté une approche comparative faisant intervenir un nombre limité de substances d'essai et de laboratoires, sans tests d'échantillons codés, de façon à respecter l'intention première d'économiser les ressources et de préserver les animaux. L'étude comparative de validation du bioessai utérotrophique chez la jeune femelle de souris adulte ovariectomisée indique une bonne correspondance qualitative et quantitative des données obtenues chez le rat et chez la souris. Lorsque les résultats du bioessai utérotrophique sont obtenus préalablement à une étude à long terme, cela permet d'utiliser les animaux de la même souche et de la même source dans les deux études. L'approche comparative n'a été utilisée que sur la souris ovariectomisée et l'ensemble de données fournies dans le rapport n'est pas assez solide pour valider le modèle sur la souris femelle immature, c'est pourquoi ce modèle n'entre pas dans le champ d'application de la présente méthode d'essai.

▼M5

18. Ainsi, dans certains cas, la souris pourra être utilisée à la place du rat. Ce choix devra être justifié par des données toxicologiques, pharmacocinétiques et/ou par d'autres critères. Il pourra nécessiter certaines modifications du protocole. Par exemple, la consommation alimentaire d'une souris rapportée à son poids corporel est plus élevée que celle d'une rate, c'est pourquoi la quantité de phytœstrogènes contenue dans les aliments devra être plus faible pour la souris que pour le rat (9) (20) (22).

Conditions d'élevage et d'alimentation

19. Toutes les procédures doivent être conformes aux normes locales relatives à l'entretien des animaux de laboratoire. Les conditions d'entretien et de traitement décrites ici sont des normes minimales et seront remplacées par la réglementation applicable, notamment la directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (38). La température du local expérimental doit être de 22 °C (± 3 °C). Le taux d'humidité relative devrait être d'au moins 30 % et, de préférence, ne pas dépasser 70 % en dehors des heures de nettoyage du local. On s'efforcera de maintenir le taux d'humidité entre 50 et 60 %. Un éclairage artificiel est utilisé. La séquence doit être de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité.

20. Les animaux recevront de la nourriture et de l'eau potable à volonté. Les jeunes animaux adultes peuvent être placés dans des cages individuelles ou collectives pouvant contenir jusqu'à 3 individus. Compte tenu de leur jeune âge, les animaux immatures seront de préférence placés dans des cages collectives.

21. On sait que les aliments pour animaux de laboratoire contenant des niveaux élevés de phytœstrogènes font augmenter le poids utérin chez les rongeurs dans des proportions suffisantes pour interférer avec le bioessai utérotrophique (13) (14) (15). Des taux élevés de phytœstrogènes et d'énergie métabolisable dans la nourriture de laboratoire peuvent aussi induire une puberté précoce si l'on utilise des animaux immatures. La présence de phytœstrogènes résulte principalement de l'inclusion de soja et d'alfalfa dans les mélanges de laboratoire, et il a été constaté que les concentrations de phytœstrogènes variaient selon les lots de mélange standard (23). Le poids corporel est une variable importante, étant donné que la quantité de nourriture consommée lui est corrélée. Par conséquent, la dose de phytœstrogène effectivement consommée avec le même régime peut varier selon les espèces et les âges (9). En ce qui concerne les rats femelles immatures, la consommation alimentaire rapportée au poids corporel peut représenter près du double de celle des jeunes femelles adultes ovariectomisées. Pour les jeunes souris adultes, la consommation alimentaire rapportée au poids corporel peut représenter environ quatre fois celle des jeunes rates adultes ovariectomisées.

22. Les résultats du bioessai utérotrophique (9) (17) (18) (19) indiquent toutefois que de faibles quantités de phytœstrogènes sont acceptables dans la nourriture et ne réduisent pas la sensibilité du bioessai. À titre indicatif, les quantités de phytœstrogènes dans les aliments ne doivent pas dépasser 350 µg d'équivalents génistéine/gramme de mélange de laboratoire pour les rates immatures Sprague Dawley et Wistar (6) (9). Ce régime devrait aussi convenir pour les essais sur les jeunes rates adultes ovariectomisées, car la consommation de nourriture rapportée au poids corporel est moins importante chez les jeunes adultes que chez les animaux immatures. Si l'on doit utiliser des souris adultes ovariectomisées ou des rates plus sensibles aux phytœstrogènes, il faudra envisager de réduire les niveaux de phytœstrogènes en conséquence (20). De plus, les quantités différentes d'énergie métabolisable dans les différents régimes peuvent décaler le début de la puberté (21) (22).

▼M5

23. Avant de commencer l'étude, le régime alimentaire sera soigneusement établi en veillant à éviter les taux élevés de phytœstrogènes [voir (6) (9)] ou d'énergie métabolisable, qui peuvent fausser les résultats (15) (17) (19) (22) (36). Il importe de contrôler ces deux facteurs pour assurer la bonne marche du dispositif d'essai utilisé par le laboratoire conformément aux paragraphes 26 et 27. Par mesure de sécurité et en application des bonnes pratiques de laboratoire, un échantillon représentatif de chaque lot de nourriture administré durant l'étude sera prélevé pour permettre une analyse de la présence de phytœstrogènes (par exemple en cas de poids utérin élevé chez les animaux témoins par rapport aux données précédentes, ou de réponse inadéquate à l'œstrogène de référence, 17α-éthinylestradiol). Les aliquotes doivent être analysées dans le cadre de l'étude ou congelées à – 20 °C ou conservées selon une méthode permettant d'éviter que l'échantillon ne se décompose avant analyse.

24. Certains types de litières peuvent contenir des substances œstrogéniques ou antiœstrogéniques à l'état naturel (par exemple, on sait que la rafle de maïs influe sur le cycle des rates et pourrait avoir des effets antiœstrogéniques). Le type de litière choisi devra contenir le moins possible de phytœstrogènes.

Préparation des animaux

25. Les animaux d'expérience, choisis après avoir vérifié qu'ils ne présentent pas de signes de maladie ni d'anomalie physique, sont répartis au hasard entre les groupes traités et le groupe témoin. Les cages doivent être disposées de façon à réduire le plus possible les effets éventuels de leur emplacement. Les animaux sont marqués pour permettre une identification individuelle. Pendant la période d'acclimatation, les animaux immatures doivent être gardés dans des cages avec leurs mères ou d'autres femelles allaitantes jusqu'à ce qu'ils soient sevrés. La période d'acclimatation précédant le début de l'expérience doit durer environ 5 jours pour les jeunes femelles adultes et pour les animaux immatures livrés avec leur mère ou d'autres femelles. Si les animaux immatures sont livrés sans leur mère et déjà sevrés, la période d'acclimatation devra être plus courte puisque l'administration doit commencer immédiatement après le sevrage (voir le paragraphe 29).

PROCÉDURE

Vérification des compétences du laboratoire

26. Deux options sont possibles pour vérifier les compétences d'un laboratoire:

— Opérer une vérification périodique, en se référant à une étude initiale de contrôle positif (voir le paragraphe 27). Au moins tous les 6 mois et chaque fois qu'un changement risque d'influer sur les résultats de l'essai (nouvelle formulation du mélange alimentaire, modification du personnel chargé des dissections, changement de souche animale ou de fournisseur, etc.), la sensibilité du dispositif (modèle animal) doit être vérifiée en utilisant une dose adéquate (conformément à l'étude de contrôle positive décrite au paragraphe 27) de l'œstrogène de référence: 17α-éthinylestradiol (n° CAS 57-63-6) (EE).

— Opérer des contrôles concomitants, en incluant un groupe recevant une dose appropriée de l'œstrogène de référence dans chaque essai.

Si le dispositif ne produit pas la réponse attendue, les conditions expérimentales devront être revues et modifiées en conséquence. Pour les deux approches, la dose de l'œstrogène de référence recommandée doit correspondre approximativement à la dose efficace 70 à 80.

▼M5

27. Étude de référence — témoin positif: Avant d'effectuer pour la première fois une étude suivant la présente méthode d'essai, chaque laboratoire doit démontrer ses compétences en testant la sensibilité du modèle animal et en établissant la relation dose-effet pour un œstrogène de référence, le 17α-éthinylestradiol (n° CAS 57-63-6) (EE) avec au minimum quatre doses. L'effet sur le poids utérin sera comparé aux données historiques attestées [voir référence (5)]. Si l'étude de référence ne donne pas les résultats escomptés, les conditions de l'expérience devront être revues et modifiées.

Nombre et répartition des animaux

28. Chaque groupe d'essai et de référence doit comprendre au moins 6 animaux (pour les protocoles des méthodes sur femelles immatures et ovariectomisées).

Âge des animaux immatures

29. Pour le bioessai utérotrophique pratiqué sur des animaux immatures, le jour de la naissance doit être spécifié. L'administration de la substance d'essai doit commencer assez tôt pour faire en sorte que, à la fin de la période d'administration, l'augmentation physiologique des œstrogènes endogènes associée à la puberté n'ait pas commencé. D'un autre côté, il a été constaté que les très jeunes animaux peuvent être moins réactifs. Pour définir l'âge optimal des animaux d'essai, chaque laboratoire doit se reporter à son corpus de données de référence sur la maturation.

En règle générale, le traitement des rats peut commencer immédiatement après un sevrage précoce, au jour 18 après la naissance (le jour de la naissance étant le jour 0). Il doit s'arrêter de préférence au jour 21 après la naissance, mais dans tous les cas avant le jour 25 après la naissance, car, au-delà, l'axe hypothalamo-pituito-ovarien devient fonctionnel et les taux d'œstrogènes endogènes peuvent commencer à augmenter avec accroissement concomitant des poids utérins moyens et augmentation des écarts types (2) (3) (10) (11) (12).

Procédure d'ovariectomie

30. Dans l'essai sur les rats et les souris femelles ovariectomisées (groupes d'essai et groupes témoins), l'ovariectomie doit être pratiquée entre 6 et 8 semaines d'âge. Chez le rat, 14 jours au minimum doivent s'écouler entre l'ovariectomie et la première administration afin de permettre la régression de l'utérus à un poids minimum de référence stable. Chez la souris, 7 jours au minimum doivent s'écouler entre l'ovariectomie et le premier jour de traitement. Une petite quantité de tissu ovarien suffit à produire des taux élevés d'œstrogènes en circulation (3), c'est pourquoi les animaux doivent être contrôlés avant l'essai, en observant les cellules épithéliales prélevées dans le vagin pendant au moins 5 jours consécutifs (par exemple du 10e au 14e jour après ovariectomie pour les rates). Si les animaux présentent des signes de préœstrus, ils ne doivent pas être utilisés. Ultérieurement, lors de la nécropsie, les moignons ovariens doivent être examinés pour repérer s'il reste du tissu ovarien. Si c'est le cas, les données de l'animal ne doivent pas être prises en compte dans les calculs (3).

31. L'ovariectomie est opérée sur l'animal couché sur le ventre, qui aura été convenablement anesthésié. La paroi abdominale dorsolatérale est incisée sur environ un centimètre au point médian entre la limite costale inférieure et la crête iliaque, à quelques millimètres de la marge latérale du muscle lombaire. Les ovaires sont extraits de la cavité abdominale, déposés sur un champ aseptique puis détachés au niveau de la jonction de l'oviducte et du corps utérin. Après avoir vérifié qu'aucun saignement important ne se produit, on recoud la paroi abdominale puis la peau est refermée par des autoclips ou par suture. Les points de ligature sont indiqués schématiquement à la figure 1. Une analgésie postopératoire appropriée recommandée par un vétérinaire spécialiste des rongeurs doit être pratiquée.

▼M5

Poids corporel

32. Dans la méthode sur animaux adultes ovariectomisés, le poids corporel et le poids utérin ne sont pas corrélés parce que le poids utérin est affecté par des hormones telles que les œstrogènes, mais pas par les facteurs de croissance qui régulent la taille du corps. Dans le modèle sur animaux immatures au contraire, le poids corporel est corrélé au poids utérin, pendant la période de maturation (34). Par conséquent, au début de l'étude, la variation pondérale des animaux utilisés, dans le modèle sur animaux immatures, doit être minimale et ne pas excéder± 20 % du poids moyen. Cela signifie que la taille des portées doit être standardisée par l'éleveur pour garantir que les petits de mères différentes sont nourris sensiblement de la même façon. Les animaux sont répartis de façon aléatoire par groupes (témoin et d'essai), de façon à ce qu'il n'y ait aucune différence statistique entre le poids corporel moyen des différents groupes. Il conviendra d'éviter dans la mesure du possible de mettre plusieurs animaux d'une même portée dans le même groupe de traitement, sans que cela fasse augmenter le nombre de portées nécessaires à l'étude.

Dosage

33. Deux groupes de dose et un groupe témoin suffisent habituellement pour établir si une substance d'essai peut avoir une action œstrogénique in vivo, et on préférera donc cette méthode pour des raisons de protection des animaux. Si l'objectif est d'obtenir une courbe de la relation dose-effet ou d'extrapoler les résultats à des doses plus faibles, au moins 3 groupes de dose seront nécessaires. Si l'on souhaite obtenir des informations plus poussées sur l'activité œstrogénique (estimation du pouvoir œstrogénique, par exemple), un autre système de dosage devra être envisagé. Exception faite de l'administration de la substance d'essai, les animaux du groupe témoin devront avoir exactement le même traitement que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est utilisé pour administrer la substance d'essai, le groupe témoin doit recevoir la même quantité du véhicule utilisé que les groupes traités (ou le volume le plus important administré si les groupes ne reçoivent pas les mêmes doses).

34. L'objectif, dans le cas du bioessai utérotrophique, est de choisir des doses qui assurent la survie des animaux et n'entraînent pas de détresse ni d'effets toxiques graves après 3 jours consécutifs d'administration de la substance chimique, jusqu'à une dose maximale de 1 000 mg/kg/j. Tous les niveaux de dose doivent être proposés et sélectionnés à la lumière des données existantes sur la toxicité et le comportement (toxico)-cinétique du composé testé ou des substances de même nature. Le niveau de dose le plus élevé doit être établi tout d'abord en fonction de la DL50 et/ou des informations sur la toxicité aiguë afin d'éviter le décès et la détresse ou la souffrance extrêmes des animaux (24) (25) (26). La dose la plus élevée doit représenter la dose maximale tolérée (MTD); une étude menée avec un niveau de dose ayant induit une réaction utérotrophique positive pourra aussi être acceptée. Pour opérer la sélection, on accepte généralement de larges intervalles entre les dosages (une demi-unité logarithmique, soit un facteur de progression de 3,2 ou même jusqu'à une unité logarithmique). En l'absence de données appropriées, une étude de détermination de l'ordre de grandeur peut être effectuée pour aider à définir les doses qu'il convient d'utiliser.

35. Autre solution, si l'activité œstrogénique d'un agoniste peut être estimée d'après des données in vitro (ou in silico), celles-ci pourront être prises en considération pour établir les doses. Par exemple, la quantité de substance chimique d'essai qui produira une réaction utérotrophique équivalente à celle de l'agoniste de référence (éthinylestradiol) est estimée d'après son activité évaluée in vitro par rapport à celle de l'éthinylestradiol. La dose d'essai la plus élevée sera obtenue en multipliant cette dose équivalente par un facteur adéquat (10 ou 100, par exemple).

▼M5

Détermination de l'ordre de grandeur

36. Le cas échéant, une étude de détermination de l'ordre de grandeur peut être effectuée sur un petit nombre d'animaux. À cet égard, le document d'orientation de l'OCDE n° 19 (25) qui définit les signes cliniques indicateurs de toxicité ou de détresse des animaux peut être utilisé. Si cela est réalisable dans le cadre de cette étude de détermination, après 3 jours de traitement, les utérus peuvent être excisés et pesés environ 24 heures après la dernière dose. Ces données peuvent ensuite être utilisées pour mettre au point l'étude principale (définir les doses maximales et minimales acceptables et recommander le nombre de groupes de dose).

Administration des doses

37. La substance d'essai est administrée par gavage ou injection sous-cutanée. La voie d'administration sera déterminée en tenant compte de considérations relatives au bien-être des animaux, et aux aspects toxicologiques tels que le rapport avec l'exposition humaine à la substance chimique (gavage oral pour une exposition par ingestion, injection sous-cutanée pour une exposition par inhalation ou adsorption cutanée), les propriétés physiques/chimiques de la substance d'essai et surtout les informations toxicologiques existantes et les données sur le métabolisme et le comportement cinétique (par exemple la nécessité d'éviter le métabolisme de premier passage, meilleure efficacité d'une voie d'administration plutôt que d'une autre).

38. Il est recommandé, chaque fois que cela est possible, d'envisager pour commencer l'utilisation d'une solution/suspension aqueuse. Toutefois, les ligands des récepteurs aux œstrogènes ou leurs précurseurs métaboliques sont généralement hydrophobes, c'est pourquoi on utilise le plus souvent une solution/suspension huileuse (huile de maïs, d'arachide, de sésame ou d'olive). Ces différentes huiles n'ont toutefois pas la même valeur calorique, ni la même teneur en matières grasses, c'est pourquoi le véhicule peut influer sur l'apport total d'énergie métabolisable et peut donc potentiellement modifier les paramètres mesurés, notamment le poids utérin, surtout dans la méthode sur animaux immatures (33). Ainsi, avant de commencer l'étude, le véhicule retenu doit être testé au regard de témoins sans véhicule. Les substances d'essai peuvent être dissoutes dans une quantité minimale d'éthanol à 95 % ou d'autres solvants appropriés, puis diluées dans le véhicule de l'essai aux concentrations finales voulues. Les caractéristiques toxiques du solvant doivent être connues et contrôlées sur un groupe témoin traité uniquement avec le solvant. Si la substance d'essai est considérée comme stable, on peut légèrement chauffer le mélange et le soumettre à une action mécanique vigoureuse pour faciliter sa dissolution. La stabilité de la substance d'essai dans le véhicule doit être déterminée. Si la substance d'essai est stable pendant toute la durée de l'étude, une aliquote de la substance d'essai peut être préparée, après quoi les dilutions spécifiées sont préparées quotidiennement.

39. Le calendrier d'administration dépend du modèle d'essai (voir le paragraphe 29 pour l'essai sur animaux immatures et le paragraphe 30 pour l'essai sur animaux ovariectomisés). La substance d'essai est administrée quotidiennement aux rates immatures pendant 3 jours consécutifs. Un traitement de 3 jours est également recommandé pour les rates ovariectomisées, mais des expositions plus longues peuvent être aussi acceptées et favoriser la détection de substances faiblement actives. Sur les souris femelles ovariectomisées, 3 jours de traitement doivent suffire et il ne semble pas très intéressant de porter la durée du traitement à 7 jours pour les agonistes d'œstrogènes puissants; toutefois, l'étude de validation n'a pas permis d'établir cette relation pour les œstrogènes de plus faible activité (16), aussi la durée d'administration doit-elle être prolongée jusqu'à 7 jours consécutifs chez les souris ovariectomisées. Le produit doit être administré chaque jour à heure fixe. L'administration doit se faire de façon à maintenir un niveau de dose constant par rapport au poids corporel des animaux (mg de substance d'essai par kg de poids corporel par jour). On réduira au minimum la variabilité du volume d'essai par rapport au poids corporel en adaptant les concentrations de façon à obtenir un volume constant par rapport au poids corporel à tous les niveaux de doses et pour toutes les voies d'administration.

▼M5

40. Lorsque la substance d'essai est administrée par gavage, les animaux reçoivent une seule dose quotidienne à l'aide d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal d'essai. Les directives locales d'entretien des animaux doivent être observées, mais le volume ne doit pas excéder 5 ml/kg de poids corporel, sauf dans le cas de solutions aqueuses où l'on pourra utiliser 10 ml/kg de poids corporel.

41. Lorsque la substance d'essai est administrée par injection sous-cutanée, les animaux reçoivent une seule dose quotidienne. Les doses doivent être injectées dans la région dorso-scapulaire ou lombaire à l'aide d'une aiguille stérile (de calibre 23 ou 25) et d'une seringue tuberculine. Le rasage du site d'injection est facultatif. Toute perte ou fuite au moment de l'injection ou toute administration incomplète doivent être consignées. Le volume total injecté par rate par jour ne doit pas dépasser 5 ml/kg de poids corporel, répartis entre 2 sites d'injection, sauf dans le cas de solutions aqueuses où l'on pourra utiliser 10 ml/kg de poids corporel.

Observations

Observations générales et cliniques

42. Des observations cliniques générales doivent être effectuées au moins une fois par jour, et plus fréquemment si des signes de toxicité sont constatés. Ces observations doivent être effectuées de préférence chaque jour à la (aux) même(s) heure(s) et en tenant compte du moment où les effets devraient être le plus marqués après l'administration des doses. Tous les animaux sont soumis à des observations pour contrôler la mortalité, la morbidité et les signes cliniques généraux tels que les changements de comportement, les changements au niveau de la peau, du pelage, des yeux et des muqueuses, l'apparition de sécrétions et d'excrétions et les activités végétatives (larmoiement, piloérection, taille des pupilles, respiration inhabituelle, par exemple).

Poids corporel et consommation alimentaire

43. Tous les animaux doivent être pesés quotidiennement à 0,1 g près, en commençant juste avant le début du traitement c'est-à-dire au moment de la répartition des animaux par groupes. La quantité de nourriture consommée durant la période de traitement peut aussi être mesurée cage par cage en pesant les distributeurs d'aliments. Ces données d'alimentation facultatives doivent être exprimées en grammes par rat par jour.

Dissection et pesage de l'utérus

44. Vingt-quatre heures après le dernier traitement, les rats sont euthanasiés. Idéalement, le sacrifice est effectué de façon aléatoire entre les groupes pour éviter de faire passer en premier ou en dernier l'un ou l'autre groupe, ce qui pourrait légèrement affecter les données. L'objectif du bioessai est de mesurer le poids des utérus séchés et frais. Le poids frais est celui de l'utérus et du fluide luminal. Le poids «séché» est mesuré après avoir exprimé et éliminé le contenu luminal de l'utérus.

45. Avant la dissection, le vagin sera contrôlé pour repérer une éventuelle ouverture chez les animaux immatures. La procédure de dissection commence par l'ouverture de la paroi abdominale au niveau de la symphyse pubienne. S'ils sont présents, les cornes utérines et les ovaires sont détachés de la paroi abdominale dorsale. La vessie et les uretères sont dégagés de la face ventrale et latérale de l'utérus et du vagin. Les adhérences fibreuses entre le rectum et le vagin sont libérées jusqu'à ce qu'on repère la jonction

▼M5

de l'orifice vaginal et du périnée. L'utérus et le vagin sont détachés du corps par incision de la paroi vaginale juste au-dessus de la jonction du périnée, comme indiqué à la figure 2. L'utérus doit être détaché du corps en découpant soigneusement le mésentère à son point d'attache sur toute la longueur de la façade dorsolatérale de chaque corne. Après extraction de l'utérus, la manipulation doit être assez rapide pour éviter la dessiccation des tissus. La perte de poids due à la dessiccation devient plus importante avec des tissus minces tels que l'utérus (23). S'ils sont présents, les ovaires sont détachés au niveau de l'oviducte en évitant l'écoulement de fluide luminal de la corne utérine. Si l'animal a été ovariectomisé, les cicatrices seront examinées pour repérer l'éventuelle présence de tissu ovarien. La graisse excédentaire et le tissu conjonctif doivent être éliminés. Le vagin est détaché de l'utérus juste à la base du col de l'utérus pour que celui-ci reste solidaire du corps utérin comme indiqué à la figure 2.

46. Chaque utérus doit être transféré dans un récipient pesé portant un marquage individuel (boîte de Petri ou nacelle de pesée en plastique) en continuant de veiller à ce qu'il ne se dessèche pas avant la pesée (un filtre papier légèrement imbibé de solution saline peut être placé au fond du récipient). L'utérus et le fluide luminal seront pesés à 0,1 mg près (poids frais).

47. Chaque utérus sera ensuite traité individuellement pour extraire le fluide luminal. Les deux cornes utérines seront percées ou sectionnées selon un axe longitudinal. L'utérus sera placé sur un filtre en papier légèrement humidifié (Whatman n° 3, par exemple) puis comprimé doucement avec un second morceau de filtre en papier légèrement humidifié, jusqu'à élimination complète du fluide luminal. L'utérus vidé de son contenu luminal sera ensuite pesé à 0,1 mg près (poids séché).

48. Le poids utérin en fin d'essai peut être utilisé pour vérifier que les rates immatures intactes n'ont pas dépassé l'âge applicable, bien que les données historiques de la souche utilisée par le laboratoire soient déterminantes à cet égard (voir le paragraphe 56 pour l'interprétation des résultats).

Études optionnelles

49. Après avoir été pesé, l'utérus peut être placé dans du formol à 10 % tamponné à pH neutre pour examen histopathologique après coloration hématoxyline-éosine. Le vagin peut être aussi examiné (voir le paragraphe 9). Des mesures morphométriques peuvent être par ailleurs effectuées sur l'épithélium endométrial pour opérer des comparaisons quantitatives.

DONNÉES ET RAPPORT D'ESSAIS

Données

50. Les informations suivantes doivent être fournies:

— le nombre d'animaux au début de l'essai,

— le nombre et l'identité des animaux retrouvés morts pendant l'essai ou euthanasiés en raison de leurs souffrances, ainsi que la date et l'heure des décès des animaux morts naturellement ou euthanasiés,

— le nombre et l'identité des animaux présentant des signes de toxicité, et une description des signes de toxicité observés indiquant notamment la date et l'heure de l'apparition, la durée et la sévérité des effets toxiques, et

— le nombre et l'identité des animaux présentant des lésions, et une description du type de lésions.

▼**M5**

51. Les données suivantes doivent être consignées pour chaque animal: poids corporels, poids utérin frais et poids de l'utérus séché. Des analyses statistiques unilatérales pour les agonistes doivent être utilisées pour déterminer si l'administration d'une substance d'essai provoque une augmentation statistiquement significative ($p < 0,05$) du poids utérin. Les analyses statistiques requises doivent être effectuées pour étudier les modifications liées au traitement, des poids des utérus frais et séchés. Par exemple, les données peuvent être évaluées par une analyse de covariance (ANCOVA), la covariable étant le poids corporel à la nécropsie. Une transformation logarithmique stabilisant la variance peut être opérée sur les données utérines avant l'analyse des données. Le test de Dunnett et Hsu peut être utilisé pour opérer des comparaisons par paires entre les groupes traités et les groupes témoins et pour calculer les intervalles de confiance. Une analyse des résidus studentisés peut permettre de détecter les éventuelles valeurs aberrantes et d'évaluer l'homogénéité des variances. Ces procédures ont été appliquées dans le programme de validation de l'OCDE à l'aide de la PROC GLM du Système d'analyse statistique (SAS Institute, Cary, NC), version 8 (6) (7).

52. Le rapport final doit contenir les informations suivantes:

Établissement réalisant l'essai

— Personnel chargé de l'étude et responsabilités de chacun

— Données de l'étude de référence — témoin positif et données périodiques de contrôle positif (voir les paragraphes 26 et 27)

Substance d'essai

— Caractérisation des substances d'essai

— Nature physique et, le cas échéant, propriétés physico-chimiques utiles pour la conduite de l'essai

— Méthode et fréquence de préparation des dilutions

— Données obtenues sur la stabilité

— Analyses des solutions administrées

Véhicule

— Caractérisation du véhicule de l'essai (nature, fournisseur et lot)

— Justification du choix du véhicule (s'il est autre que l'eau)

Animaux d'expérience

— Espèce et souches utilisées et justification du choix de ces espèces/souches

— Fournisseur et équipements particuliers du fournisseur

— Âge à la livraison et date de naissance

— Si les animaux sont immatures, sont-ils fournis avec leurs mères ou d'autres femelles allaitantes et date du sevrage ?

— Détails des procédures d'acclimatation des animaux

— Nombre d'animaux par cage

— Données détaillées et méthode d'identification des individus et des groupes d'animaux

Conditions de l'essai

— Détails de la procédure de randomisation (par exemple méthode utilisée)

— Justification de la sélection des doses

▼**M5**

— Détails de la formulation de la substance d'essai, concentrations obtenues, stabilité et homogénéité

— Détails relatifs à l'administration de la substance d'essai et justification de la voie d'exposition

— Alimentation (nom, type, fournisseur, composition et, s'ils sont connus, taux de phytœstrogènes)

— Eau distribuée (eau du robinet ou eau filtrée, par exemple) et mode d'administration (par tube alimenté par un grand réservoir, flacons, etc.)

— Litière (nom, type, fournisseur, composition)

— Données sur les conditions d'encagement, photopériode, température et humidité du local expérimental, nettoyage du local expérimental

— Description détaillée des procédures de nécropsie et de pesée des utérus

— Description des procédures statistiques

Résultats

Pour chaque animal

— Relevés journaliers du poids corporel (de la répartition en groupes jusqu'à la nécropsie) (à 0,1 g près)

— Âge de chaque animal (en jours à compter du jour 0, jour de la naissance) au début du traitement

— Date et heure de l'administration de chaque dose

— Volume calculé et dose administrée et observations de toute perte de produit pendant ou après l'administration

— Observations journalières sur l'état de l'animal, notamment symptômes pertinents

— Cause présumée du décès (si l'animal est trouvé mort ou moribond pendant l'étude)

— Date et heure de l'euthanasie et temps écoulé depuis l'administration de la dernière dose

— Poids utérin frais (à 0,1 mg près) et observations concernant les éventuels écoulements de fluide luminal pendant la dissection et la préparation avant pesée

— Poids utérin séché (à 0,1 mg près)

Pour chaque groupe d'animaux

— Relevés journaliers du poids corporel moyen (à 0,1 g près) et écarts types (de la répartition en groupes jusqu'à la nécropsie)

— Poids utérins moyens, frais et séché (à 0,1 mg près) et écarts types

— Si elle a été mesurée, consommation alimentaire journalière (calculée en grammes de nourriture consommée par animal)

▼M5

— Les résultats des analyses statistiques comparant les poids utérins frais et séchés des groupes traités par rapport à ceux des groupes témoins qui ont reçu le véhicule.

— Les résultats des analyses statistiques comparant le poids corporel total et la prise de poids corporel des groupes traités par rapport à ceux des groupes témoins qui ont reçu le véhicule.

53. Résumé des principaux éléments et conditions de la méthode d'essai

	Rat	**Souris**
Animaux		
Souche	Souches de rongeurs de laboratoire communément utilisées	
Nombre d'animaux	6 animaux par groupe de dose au minimum	
Nombre de groupes	Au minimum 2 groupes d'essai (voir le paragraphe 33) et un groupe témoin négatif Pour les groupes témoins positifs, se référer aux paragraphes 26 et 27	
Conditions d'encagement et d'alimentation		
T° du local expérimental	22 °C ± 3 °C	
Humidité relative	50-60 %, pas moins de 30 % et pas plus de 70 %	
Photopériode journalière	12 heures de lumière, 12 heures d'obscurité	
Alimentation et eau potable	À volonté	
Encagement	Individuel ou par groupes de jusqu'à 3 animaux (l'hébergement collectif est recommandé pour les animaux immatures)	
Alimentation et litière	Faibles niveaux de phytœstrogènes recommandés dans la nourriture et la litière	
Protocole		
Méthode	Méthode utilisant des femelles immatures non ovariectomisées (méthode à privilégier) Méthode utilisant des femelles adultes ovariectomisées	Méthode utilisant des femelles adultes ovariectomisées
Âge de traitement des animaux immatures	Pas avant le jour 18 après la naissance. Le traitement doit être achevé avant le jour 25 après la naissance	Non applicable pour cette méthode d'essai
Âge à l'ovariectomie	Entre 6 et 8 semaines d'âge	
Âge de traitement des animaux ovariectomisés	Il doit s'écouler au minimum 14 jours entre l'ovariectomie et le 1er jour du traitement	Il doit s'écouler au minimum 7 jours entre l'ovariectomie et le 1er jour du traitement
Poids corporel	La variation du poids corporel doit être minimale et ne pas dépasser ± 20 % du poids moyen	

▼M5

	Rat	Souris
Administration		
Voie d'administration	Gavage oral ou injection sous-cutanée	
Fréquence de l'administration	Une dose journalière	
Volume administré par gavage et injection	≤ 5 ml/kg de poids corporel (ou jusqu'à 10 ml/kg de poids corporel dans le cas de solutions aqueuses) (sur 2 sites d'injection par voie sous-cutanée)	
Durée de la période d'administration	3 jours consécutifs pour le modèle sur animaux immatures Au minimum 3 jours consécutifs pour le modèle sur animaux ovariectomisés	7 jours consécutifs pour le modèle sur animaux ovariectomisés
Date du sacrifice	Environ 24 heures après la dernière dose	
Résultats		
Réponse positive	Augmentation statistiquement significative du poids moyen de l'utérus (frais et/ou séché)	
Œstrogène de référence	17α-éthinylestradiol	

ORIENTATIONS POUR L'INTERPRÉTATION ET L'ACCEPTATION DES RÉSULTATS

54. En général, un essai évaluant le pouvoir œstrogénique doit être considéré comme positif si l'on constate une augmentation statistiquement significative du poids utérin ($p < 0,05$) au moins chez le groupe traité avec la dose la plus élevée par rapport au groupe témoin qui a reçu le solvant. Un résultat positif est confirmé par la démonstration d'une relation biologiquement plausible entre la dose et l'ampleur de l'effet produit, sans perdre de vue que les effets œstrogéniques et antiœstrogéniques conjugués de la substance d'essai peuvent modifier la forme de la courbe dose-effet.

55. Il importe de veiller à ne pas dépasser la dose maximale tolérée pour pouvoir interpréter avec profit les données. La réduction du poids corporel, les signes cliniques et les autres données observées devront être soigneusement évalués à cet effet.

56. Il est important, pour pouvoir accepter les données du bioessai utérotrophique, de considérer les poids utérins des animaux du groupe témoin qui a reçu le véhicule. Des valeurs témoins élevées peuvent compromettre la réactivité du bioessai et sa capacité de détection des agonistes des œstrogène de faible puissance. L'étude des données issues de la littérature et des données obtenues lors de la validation du bioessai utérotrophique semblent montrer que les moyennes de référence peuvent être élevées spontanément, en particulier chez les animaux immatures (2) (3) (6) (9). Le poids utérin des rates immatures dépend de nombreuses variables, notamment de la souche ou du poids corporel, c'est pourquoi aucune limite supérieure précise ne peut être indiquée pour le poids utérin. À titre indicatif, si le poids des utérus séchés des rates immatures du groupe témoin est compris entre 40 et 45 mg, les résultats peuvent être considérés comme suspects et des poids utérins supérieurs à 45 mg peuvent nécessiter de refaire l'essai. Il conviendra cependant de procéder à une évaluation au cas par cas (3) (6) (8). Dans l'essai sur des rates adultes, toute ovariectomie incomplète peut laisser des tissus ovariens susceptibles de produire des œstrogènes endogènes et de retarder la régression du poids utérin.

▼M5

57. Pour les groupes témoins qui ont reçu le véhicule, l'obtention d'utérus séchés de poids inférieurs à 0,09 % du poids corporel pour les rates immatures et à 0,04 % pour les jeunes adultes ovariectomisées semble donner des résultats acceptables [voir tableau 31 (2)]. Si les poids utérins de référence sont supérieurs à ces valeurs, plusieurs facteurs doivent être vérifiés, notamment l'âge des animaux, la qualité de l'ovariectomie, les phytœstrogènes présents dans l'alimentation, et tout résultat négatif (pas d'indication d'activité œstrogénique) devra être considéré avec prudence.

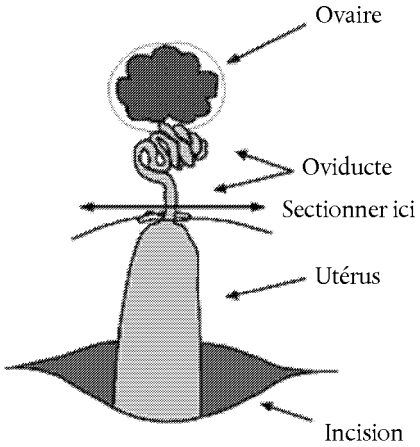
58. Les données historiques concernant les groupes témoins qui ont reçu le véhicule doivent être conservées dans le laboratoire. Les données historiques concernant les effets des œstrogènes témoins positifs, tels que le 17α-éthinylestradiol, doivent aussi être conservées dans le laboratoire. Les laboratoires peuvent aussi tester les effets d'agonistes d'œstrogènes connus pour leur faible activité. Toutes ces données peuvent être comparées aux données dont on dispose (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) pour s'assurer que la sensibilité des méthodes du laboratoire est suffisante.

59. Lors de l'étude de validation de l'OCDE, la variabilité pondérale est apparue plus faible pour les utérus séchés que pour les utérus frais (6) (7). Toutefois, on considère qu'une réponse significative dans l'un ou l'autre cas indiquera que la substance d'essai est positive (activité œstrogénique).

60. La réponse utérotrophique n'est pas uniquement d'origine œstrogénique mais, s'il s'avère positif, le bioessai utérotrophique devra généralement être interprété comme preuve d'une activité œstrogénique potentielle in vivo, et devra normalement donner lieu à recherches plus poussées (voir le paragraphe 9 et le «Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens», appendice 2).

Figure 1

Schéma de l'ablation chirurgicale des ovaires



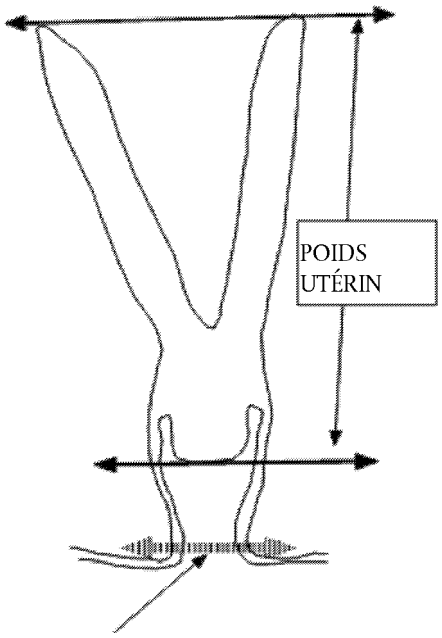
Mésomètre, réseau vasculaire et couche graisseuse non représentés

La procédure commence en ouvrant la paroi abdominale dorsolatérale au point médian entre la limite costale inférieure et la crête iliaque, et à quelques millimètres de la marge latérale du muscle lombaire. Les ovaires sont localisés dans la cavité abdominale. Sur un champ aseptique, on extrait les ovaires de la cavité abdominale, on pose une ligature entre l'ovaire et l'utérus pour arrêter le saignement, puis on détache l'ovaire par incision au-dessus de la ligature à la jonction de l'oviducte et de chaque corne utérine. Après avoir vérifié qu'aucun saignement important ne persiste, la paroi abdominale doit être recousue, et la peau refermée par des autoclips ou par suture, par exemple. On laisse ensuite les animaux se rétablir et le poids de l'utérus régresser pendant au moins 14 jours avant utilisation.

▼**M5**

Figure 2

Prélèvement et préparation des tissus utérins avant pesée



La procédure commence par l'ouverture de la paroi abdominale au niveau de la symphyse pubienne. On détache chaque ovaire, s'ils sont présents, et chaque corne utérine de la paroi abdominale dorsale. La vessie et les uretères sont dégagés de la face ventrale et latérale de l'utérus et du vagin. Les adhérences fibreuses entre le rectum et le vagin sont libérées jusqu'à ce qu'on repère la jonction de l'orifice vaginal et du périnée. L'utérus et le vagin sont détachés du corps par incision de la paroi vaginale juste au-dessus de la jonction du périnée comme indiqué sur la figure. L'utérus doit être détaché du corps en découpant soigneusement le mésentère à son point d'attache sur toute la longueur de la façade dorsolatérale de chaque corne utérine. Après prélèvement, on élimine la graisse excédentaire et le tissu conjonctif. S'ils sont présents, les ovaires sont détachés de l'oviducte en évitant l'écoulement de fluide luminal de la corne utérine. Si l'animal a été ovariectomisé, les cicatrices doivent être examinées pour repérer l'éventuelle présence de tissu ovarien. Le vagin est détaché de l'utérus à la base du col de l'utérus pour que celui-ci reste solidaire du corps utérin, comme l'indique la figure. L'utérus peut alors être pesé.

▼**M5**

Appendice 1

DÉFINITIONS

Pouvoir antiœstrogénique: capacité d'une substance chimique à supprimer l'action de l'estradiol-17ß chez les mammifères.

Date de naissance: jour 0 après la naissance.

Dosage: terme général recouvrant la dose, la fréquence d'administration et la durée d'administration.

Dose: quantité de substance d'essai administrée. Dans le bioessai utérotrophique, la dose est exprimée en poids de substance d'essai par unité de poids corporel de l'animal d'expérience par jour (mg/kg de poids corporel/jour).

Dose maximale tolérée (DMT): quantité maximale d'une substance qui, lorsqu'elle est introduite dans le corps, n'est pas fatale aux animaux d'expérience (indiquée par la DL0) (UICPA, 1993)

Pouvoir œstrogénique: capacité d'une substance chimique à agir comme l'estradiol-17ß chez les mammifères.

Jour X (après la naissance): Xe jour de vie après le jour de la naissance.

Sensibilité: proportion de toutes les substances positives/actives correctement classées par l'essai. Elle mesure l'exactitude d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriques et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai.

Spécificité: proportion de toutes les substances négatives/inactives correctement classées par l'essai. Elle mesure l'exactitude d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriques et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai.

Substance chimique: une substance ou un mélange

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Utérotrophique: terme utilisé pour décrire une influence positive sur la croissance des tissus utérins.

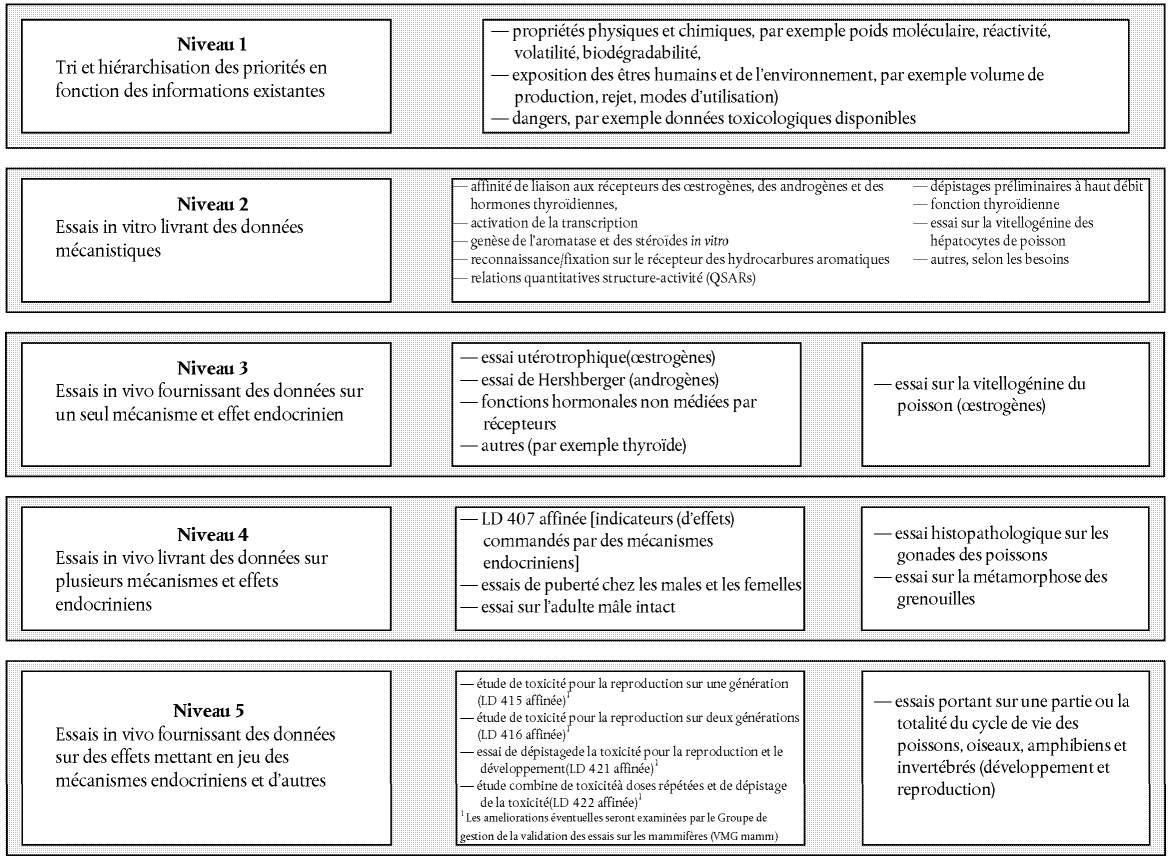
Validation: procédure scientifique destinée à caractériser les exigences et limitations opérationnelles d'une méthode d'essai et à démontrer sa fiabilité et son applicabilité à une fin donnée.

▼M5

Appendice 2

Note: Document prepare par le secretariat du programme sur les lignes directrices à partir de l'accord conclu à la 6e reunion du groupe d'étude sur l'essai et l'évaluation des perturbateurs endocriniens (EDTA)

Cadre conceptuelde l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens



Notes se rapportant au cadre conceptuel

▼**M5**

NOTES SE RAPPORTANT AU CADRE CONCEPTUEL

Note 1: Il est possible d'entrer dans le cadre et d'en sortir à tous les niveaux, suivant la nature des informations nécessaires.

Note 2: Le niveau 5 relatif à l'écotoxicologie devrait inclure des indicateurs mettant en évidence le mode d'action des effets néfastes et d'éventuels dégâts au niveau des populations.

Note 3: S'il existe un modèle multimodal couvrant plusieurs des essais fournissant des données sur un seul indicateur, ce modèle doit remplacer ces essais.

Note 4: L'évaluation de chaque substance chimique est à effectuer au cas par cas, à la lumière de toutes les informations disponibles et compte tenu de la fonction des niveaux du cadre.

Note 5: La version actuelle du cadre ne doit pas être considérée comme exhaustive. Aux niveaux 3, 4 et 5, elle inclut des essais déjà disponibles ou en cours de validation. Ces derniers sont provisoirement inclus; ils seront confirmés une fois mis au point et validés.

Note 6: La portée des essais du niveau 5 n'est pas strictement limitée. Les essais incorporés à ce niveau servent à l'évaluation des dangers et des risques.

▼M5

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (1998), Rapport de la première réunion du Groupe d'étude de l'OCDE sur l'essai et l'évaluation des perturbateurs endocriniens (EDTA), 10 et 11 mars 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) OCDE (2003), Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: résumé de la documentation disponible à l'appui du projet du Groupe d'étude de l'OCDE sur l'essai et l'évaluation des perturbateurs endocriniens (EDTA) en vue de normaliser et valider le bio-essai utérotrophique, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et évaluations, n° 38, ENV/JM/MONO(2003)1.

(3) Owens, J.W., et Ashby, J. (2002), Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent, Crit. Rev. Toxicol., 32:445-520.

(4) OCDE (2006), OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay — Phase 1, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et évaluations, n° 65, ENV/JM/MONO(2006)33.

(5) Kanno, J., Onyon, L., Haseman, J., Fenner-Crisp, P., Ashby, J., et Owens, W. (2001), The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1, Environ Health Perspect., 109:785-94.

(6) OCDE (2006), OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 — Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et évaluations, n° 66, ENV/JM/MONO(2006)34.

(7) Kanno, J., Onyon, L., Peddada, S., Ashby, J., Jacob, E., et Owens, W. (2003), The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dose Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549

(8) Kanno, J., Onyon, L., Peddada, S., Ashby, J., Jacob, E., et Owens, W. (2003), The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Coded Single Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

(9) Owens, W., Ashby, J., Odum, J., et Onyon, L. (2003), The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dietary phytœstrogene analyses, Environ. Health Persp., 111:1559-1567.

(10) Ogasawara, Y., Okamoto, S., Kitamura, Y., Matsumoto, K. (1983), Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [I^{125}]iododeoxyuridine, Endocrinology, 113:582-587.

(11) Branham, W.S., Sheehan, D.M., Zehr, D.R., Ridlon, E., et Nelson, C.J. (1985), The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17ß-oestradiol, Endocrinology, 117:2229-2237.

(12) Schlumpf, M., Berger, L., Cotton, B., Conscience-Egli, M., Durrer, S., Fleischmann, I., Haller, V., Maerkel, K., et Lichtensteiger, W. (2001), Estrogen active UV screens, SÖFW-J, 127:10-15.

(13) Zarrow, M.X., Lazo-Wasem, E.A., et Shoger, R.L. (1953), Estrogenic activity in a commercial animal ration, Science, 118:650-651.

(14) Drane, H.M., Patterson, D.S.P., Roberts, B.A., et Saba, N. (1975), The chance discovery of œstrogenic activity in laboratory rat cake, Fd. Cosmet. Toxicol., 13:425-427.

(15) Boettger-Tong, H., Murphy, L., Chiappetta., C, Kirkland, J.L., Goodwin, B., Adlercreutz, H., Stancel, G.M., et Makela, S. (1998), A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on in vivo responses to exogenously administered estrogens, Environ. Health Perspec., 106:369-373.

▼**M5**

(16) OCDE (2007), Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et évaluations, n° 67.

(17) Degen, G.H., Janning, P., Diel, P., et Bolt, H.M. (2002), Estrogenic isoflavones in rodent diets, Toxicol. Lett., 128:145-157.

(18) Wade, M.G., Lee, A., McMahon, A., Cooke, G., et Curran, I. (2003), The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats, Food Chem. Toxicol., 41:1517-1525.

(19) Yamasaki, K., Sawaki, M., Noda, S., Wada, T., Hara, T., et Takatsuki, M. (2002), Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytœstrogen content diets and the ovarien changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide, Arch. Toxicol., 76:613-620.

(20) Thigpen, J.E., Haseman, J.K., Saunders, H.E., Setchell, K.D.R., Grant, M.F., et Forsythe, D. (2003), Dietary phytœstrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice, Comp. Med., 53:477-485.

(21) Ashby, J., Tinwell, H., Odum, J., Kimber, I., Brooks, A.N., Pate, I., et Boyle, C.C. (2000), Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development, J. Appl. Toxicol., 20:343-347.

(22) Thigpen, J.E., Lockear, J., Haseman, J., Saunders, H.E., Caviness, G., Grant, M.F., et Forsythe, D.B. (2002), Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays, Cancer Detect. Prev., 26:381-393.

(23) Thigpen, J.E., Li, L.-A., Richter, C.B., Lebetkin, E.H., et Jameson, C.W. (1987), The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay, Lab. Anim. Sci., 37:596-601.

(24) OCDE (2008), Toxicité aiguë par voie orale: méthode de l'ajustement des doses, ligne directrice n° 425 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.

(25) OCDE (2000), Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et évaluations, n° 19, ENV/JM/MONO(2000)7.

(26) OCDE (2001), Guidance document on acute oral toxicity, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et évaluations, n° 24, ENV/JM/MONO(2001)4.

(27) Bulbring, E., et Burn, J.H. (1935), The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution, J. Physiol., 85: 320-333.

(28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F., et Koch, F.C. (1936), The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis, Endocrinology, 19: 33-41.

(29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C., et Neal, B.H. (1996), Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization, Fundam. Appl. Toxicol., 34: 288-305.

(30) Jones, R.C., et Edgren, R.A. (1973), The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat, Fertil. Steril., 24: 284-291.

(31) OCDE (1982), Organisation de coopération et de développement économiques — Principes de l'OCDE relatifs aux bonnes pratiques de laboratoire, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

(32) Dorfman, R.I. (1962), Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization, New York, Academic Press.

(33) Thigpen, J.E. e.a. (2004), Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies, ILAR J 45(4): 401-416.

▼**M5**

(34) Gray, L.E., et Ostby, J. (1998), Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism, Toxicol Ind Health, 14 (1-2): 159-184.

(35) Booth, A.N., Bickoff, E.M., et Kohler, G.O. (1960), Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products, Science, 131:1807-1808.

(36) Kato, H., Iwata, T., Katsu, Y., Watanabe, H., Ohta, Y., et Iguchi, T. (2004), Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay, J. Agric Food Chem., 52, 14101414.

(37) OCDE (2007), Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Anticœstrogenicity, Series on Testing and Assessment, No. 71.

(38) Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (JO L 276 du 20.10.2010, p. 33).

▼M5

B.55. **BIOESSAI DE HERSHBERGER SUR LE RAT: ESSAI DE DEPISTAGE A COURT TERME DE PROPRIETES (ANTI)ANDROGENIQUES**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice pour les essais de produits chimiques n° 441 (2009) de l'OCDE. L'OCDE a lancé, en 1998, une activité à caractère hautement prioritaire dans le but de réviser les lignes directrices existantes et d'en établir de nouvelles relatives au dépistage et à l'essai des substances susceptibles de perturber le système endocrinien (1). L'une des composantes de cette activité concernait le développement d'une ligne directrice pour le bioessai de Hershberger sur le rat. Après plusieurs décennies d'utilisation par l'industrie pharmaceutique, cet essai a été pour la première fois normalisé par un comité d'experts officiels en 1962 comme outil de dépistage de substances chimiques androgéniques (2). Entre 2001 et 2007, le bioessai de Hershberger sur le rat a fait l'objet d'un programme de validation approfondi, comprenant notamment la constitution d'un document d'examen détaillé (23), la compilation d'un article détaillé sur les méthodes (3), l'élaboration d'un guide de dissection (21) et la mise en œuvre d'études intra- et interlaboratoires poussées visant à démontrer la fiabilité et la reproductibilité du bioessai. Ces études de validation ont été menées à l'aide d'un androgène de référence fortement actif [propionate de testostérone (TP)], de deux androgènes synthétiques fortement actifs (acétate de trenbolone et méthyltestostérone), d'un produit pharmaceutique antiandrogénique fortement actif (flutamide), d'un inhibiteur fortement actif (finastéride) de la synthèse de l'androgène naturel (dihydrotestostérone-DHT), de plusieurs pesticides faiblement antiandrogéniques (linuron, vinclozoline, procymidone, p,p' DDE), d'un inhibiteur de 5α-réductase fortement actif (finastéride) et de deux substances chimiques négatives connues (dinitrophénol et nonylphénol) (4) (5) (6) (7) (8). La présente méthode d'essai résulte de la longue expérience acquise par l'utilisation du bioessai et de l'expérience acquise au cours du programme de validation et des résultats obtenus.

2. Le bioessai de Hershberger est un essai de dépistage in vivo à court terme qui emploie des tissus accessoires de l'appareil reproducteur mâle. L'essai date des années 30 et il a été modifié dans les années 40 par l'inclusion de muscles de l'appareil reproducteur mâle qui répondent aux androgènes (2) (9-15). Au cours des années 60, plus de 700 androgènes putatifs ont été évalués à l'aide d'une version normalisée du mode opératoire (2) (14), et l'utilisation de l'essai a été considérée comme une méthode standard aussi bien pour les androgènes que pour les antiandrogènes pendant les années 60 (2) (15). L'essai biologique actuel est fondé sur les variations de poids de cinq tissus dépendant des androgènes chez le rat mâle péripubertaire castré. Il évalue la capacité d'une substance chimique à induire des activités biologiques analogues à celles induites par des agonistes et des antagonistes d'androgènes ou des inhibiteurs de 5α-réductase. Les cinq tissus cibles dépendant des androgènes inclus dans la présente méthode d'essai sont la prostate ventrale (PV), la vésicule séminale (VS) (plus les fluides et les glandes coagulantes), les muscles élévateurs de l'anus et bulbocaverneux (EABC), la paire de glandes de Cowper (COW) et le gland (G). Chez le rat mâle péripubertaire castré, ces cinq tissus répondent tous aux androgènes par une augmentation du poids absolu. Lorsqu'ils sont stimulés en vue d'augmenter leur poids par l'administration d'un androgène de référence fortement actif, ces cinq tissus répondent tous aux antiandrogènes par une diminution du poids absolu. Le premier modèle du bioessai de Hershberger est le mâle péripubertaire chirurgicalement castré, et il a été validé dans les phases 1, 2 et 3 du programme de validation de Hershberger.

3. Le bioessai de Hershberger est utilisé comme un test de dépistage mécanistique in vivo des agonistes d'androgènes, des antagonistes d'androgènes et des inhibiteurs de 5α-réductase, et son application est envisagée dans le contexte du «Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens» (appendice 2). Dans ce cadre conceptuel, le

▼M5

bioessai de Hershberger se situe au niveau 3 en tant qu'essai in vivo fournissant des données sur un seul mécanisme endocrinien, à savoir l'(anti)androgénicité. Il est destiné à faire partie d'une batterie d'essais in vitro et in vivo permettant d'identifier les substances chimiques susceptibles d'interagir avec le système endocrinien et, à terme, d'évaluer les risques et les dangers pour la santé humaine ou l'environnement.

4. Compte tenu des problèmes de bien-être des animaux posés par la castration, le mâle sevré stimulé intact (non castré) a été étudié comme modèle alternatif pour l'essai Hershberger afin d'éviter l'étape de castration. La méthode d'essai utilisant le mâle sevré stimulé a été validée (24). Cependant, dans les études de validation, le modèle adulte sevré de l'essai Hershberger n'a pas montré sa capacité à détecter de façon régulière les effets de substances à faible activité antiandrogène sur le poids d'organes dépendant des androgènes, aux doses testées. C'est la raison pour laquelle ce modèle n'a pas été inclus dans la présente méthode d'essai. Toutefois, considérant que son utilisation peut avoir non seulement des avantages en termes de bien-être des animaux, mais peut aussi fournir des informations sur d'autres modes d'action, il est disponible dans le document d'orientation n° 115 de l'OCDE (25).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITATIVES

5. Les agonistes et les antagonistes d'androgènes agissent comme des ligands du récepteur d'androgène et peuvent activer ou inhiber, respectivement, la transcription des gènes contrôlée par le récepteur. De surcroît, certaines substances chimiques inhibent la conversion de la testostérone en androgène dihydrotestostérone naturel plus actif dans certains tissus cibles des androgènes (inhibiteurs de 5α-réductase). Ces substances peuvent avoir des effets néfastes pour la santé, y compris des effets sur la reproduction et le développement. Par conséquent, il est nécessaire, dans des objectifs de réglementation, d'estimer et d'évaluer rapidement les potentialités d'agoniste ou d'antagoniste des androgènes ou d'inhibiteur de 5α-réductase d'une substance chimique. Même si leur valeur informative est appréciable, l'affinité d'un ligand pour un récepteur d'androgène telle que mesurée par sa liaison au récepteur ou par l'activation de la transcription de gènes reporters in vitro n'est pas le seul déterminant d'un danger éventuel. D'autres facteurs critiques sont l'activation et la désactivation métaboliques lors de l'entrée dans l'organisme, la distribution des substances entre les tissus cibles et l'élimination de l'organisme. Il est par conséquent nécessaire de détecter l'activité éventuelle d'une substance chimique in vivo dans des conditions opératoires et d'exposition appropriées. L'évaluation in vivo est moins cruciale si les caractéristiques ADME (absorption, distribution, métabolisme, élimination) de la substance chimique sont connues. Les tissus dépendant des androgènes répondent par une croissance rapide et vigoureuse à une stimulation par des androgènes, notamment chez les rats mâles péripubertaires castrés. Les rongeurs, en particulier le rat, sont aussi largement utilisés dans les études de toxicité visant à caractériser les dangers. Par conséquent, la version de l'essai qui emploie le rat péripubertaire castré et les cinq tissus cibles convient au dépistage in vivo d'agonistes et d'antagonistes des androgènes et d'inhibiteurs de 5α-réductase.

6. La présente méthode d'essai est fondée sur les protocoles employés dans l'étude de validation de l'OCDE qui se sont révélés fiables et reproductibles dans les analyses intra- et interlaboratoires (4) (5) (6) (7) (8). Dans cette méthode d'essai sont présentés des protocoles pour les androgènes et pour les antiandrogènes.

7. La dose de TP utilisée pour détecter les antiandrogènes dans le programme de validation du bioessai de Hershberger de l'OCDE variait légèrement selon les différents laboratoires (0,2 versus 0,4 mg/kg/j par injection sous-cutanée), mais la capacité à détecter une activité antiandrogénique faible ou forte présentait peu de différence entre ces deux variantes du mode opératoire. De toute évidence, il ne faut pas utiliser une dose de TP trop élevée qui bloquerait les effets des antagonistes de récepteurs d'androgènes (RA) faibles, ni une dose trop faible, car les tissus androgéniques ne présenteraient alors qu'une réponse de croissance limitée même sans coadministration d'antiandrogène.

▼**M5**

8. La réponse de croissance des tissus dépendant des androgènes individuels n'est pas entièrement d'origine androgénique, des substances qui ne sont pas des agonistes d'androgènes pouvant modifier le poids de certains tissus. Toutefois, la réponse de croissance simultanée de plusieurs tissus corrobore l'hypothèse d'un mécanisme plus spécifique des androgènes. Par exemple, des doses élevées d'œstrogènes fortement actifs peuvent augmenter le poids des vésicules séminales; cependant, les autres tissus dépendant des androgènes de l'essai ne répondront pas de manière similaire. Les substances chimiques antiandrogéniques peuvent agir comme des antagonistes des récepteurs d'androgènes ou des inhibiteurs de 5α-réductase. L'effet des inhibiteurs de 5α-réductase est variable, car la conversion en dihydrotestostérone plus active varie selon les tissus. Les antiandrogènes qui inhibent la 5α-réductase, comme le finastéride, ont des effets plus marqués dans la prostate ventrale que dans les autres tissus lorsqu'on les compare à un antagoniste de RA fortement actif comme le flutamide. Cette différence de réponse en fonction des tissus peut être utilisée pour distinguer les modes d'action médiés par les RA de ceux médiés par la 5α-réductase. De surcroît, le récepteur d'androgène est apparenté en termes d'évolution à celui d'autres hormones stéroïdiennes, et certaines autres hormones, administrées à des doses élevées supraphysiologiques peuvent lier le TP et jouer un rôle d'antagoniste de ses effets d'activation de la croissance (13). De plus, il est également plausible qu'un métabolisme stéroïdien activé et un abaissement corollaire de la teneur sérique en testostérone puissent réduire la croissance des tissus dépendant des androgènes. Par conséquent, tout résultat positif dans le bioessai de Hershberger est normalement évalué par une approche par éléments de preuve qui comprend des essais in vitro, tels que les essais de liaison aux RA et aux récepteurs œstrogéniques (RE) et des essais d'activation de la transcription correspondants, ou d'autres essais in vivo qui analysent des tissus cibles des androgènes similaires, tels que l'essai sur mâle pubère, l'essai sur mâle adulte intact de 15 jours ou les essais à doses répétées pendant 28 jours ou 90 jours.

9. L'expérience montre que les androgènes xénobiotiques sont plus rares que les antiandrogènes xénobiotiques. On s'attend par conséquent à utiliser plus souvent le bioessai de Hershberger pour le dépistage d'antiandrogènes. Toutefois, le mode opératoire d'essai d'androgènes est parfois recommandé pour des substances chimiques stéroïdiennes ou analogues aux stéroïdes ou pour des substances chimiques pour lesquelles des méthodes intégrées au niveau 1 ou 2 du Cadre conceptuel (appendice 2) ont fourni une indication d'éventuels effets androgéniques. De la même manière, des effets indésirables associés à des profils (anti)androgéniques peuvent être observés dans des essais de niveau 5 et nécessiter une évaluation visant à déterminer si une substance agit par un mode d'action endocrine.

10. Il est admis que tous les protocoles faisant appel à des animaux respectent les normes locales en matière de bien-être animal; les descriptifs des soins et traitements figurant ci-après constituent donc des normes minimales auxquelles se substitueront les réglementations locales telles que la directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (26). D'autres recommandations relatives au traitement humain des animaux ont été formulées par l'OCDE (17).

11. Comme c'est le cas de tous les essais biologiques sur animaux expérimentaux, il conviendra d'évaluer soigneusement la nécessité d'une mise en œuvre de cette étude. Fondamentalement, deux raisons peuvent justifier une telle décision:

— risque d'exposition élevé (niveau 1 du Cadre conceptuel) ou indications d'une (anti)androgénicité dans des essais in vitro (niveau 2) incitant à mener des études en vue de déterminer si ces effets pourraient s'exercer in vivo,

— effets de nature (anti)androgénique dans des essais in vivo de niveau 4 ou 5 justifiant la mise en œuvre d'études sur le mode d'action spécifique, par exemple afin de déterminer si les effets sont dus à un mécanisme (anti)androgénique.

▼M5

12. La définition des termes utilisés dans la présente méthode d'essai figure à l'appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

13. La sensibilité du bioessai de Hershberger est due à l'utilisation de mâles chez lesquels la production d'androgènes endogènes est minimale. En effet, les mâles sont castrés et la castration est suivie d'un délai adéquat permettant la régression des tissus cibles jusqu'à un poids de base minimal et uniforme. Ainsi, lors de la détection d'une activité androgénique potentielle, les teneurs endogènes en androgènes en circulation sont faibles, l'axe hypothalamique-pituitaire-gonadal est incapable de les compenser par des mécanismes de rétroaction, la capacité des tissus à répondre est maximale, et la variabilité du poids initial des tissus est minimale. Lors de la détection d'une activité antiandrogénique potentielle, il est possible d'obtenir un gain pondéral des tissus plus substantiel lorsque ceux-ci sont stimulés par un androgène de référence. Par conséquent, dans le bioessai de Hershberger, il ne faut que 6 animaux par groupe de dose alors que, dans d'autres essais qui emploient des mâles pubères ou adultes, l'utilisation de 15 mâles par groupe de dose est conseillée.

14. La castration des rats mâles péripubertaires est réalisée de manière appropriée à l'aide d'anesthésiques et d'une technique aseptique approuvés. Des analgésiques sont administrés durant les quelques jours qui suivent l'intervention chirurgicale afin d'éliminer la gêne postchirurgicale. La castration améliore la précision avec laquelle l'essai détecte les androgènes et les antiandrogènes faibles en supprimant les mécanismes de rétroaction endocrines compensatoires qui existent chez l'animal intact et peuvent atténuer les effets des androgènes et des antiandrogènes administrés, et élimine la large variabilité interindividus des teneurs sériques en testostérone. Par conséquent, la castration réduit les nombres d'animaux requis pour le dépistage de ces activités endocrines.

15. Pour détecter une activité androgénique potentielle, la substance d'essai est administrée chaque jour par gavage oral ou injection sous-cutanée (sc) pendant une période de 10 jours consécutifs. Les substances d'essai sont administrées à au moins deux groupes de traitement d'animaux expérimentaux en utilisant un niveau de dose par groupe. Les animaux sont autopsiés environ 24 heures après l'administration de la dernière dose. Une augmentation de poids statistiquement significative de deux des organes cibles ou plus dans les groupes recevant la substance d'essai comparés aux groupes témoin recevant le véhicule indique un résultat positif pour la substance d'essai relativement à l'activité androgénique potentielle (voir paragraphe 60). Les androgènes comme la trenbolone, qui ne peuvent être réduits en 5α, présentent des effets sur l'EABC et le gland plus prononcés que ceux du TP, mais tous les tissus doivent présenter une augmentation de la croissance.

16. Pour détecter une activité antiandrogénique potentielle, la substance d'essai est administrée chaque jour par gavage oral ou injection sous-cutanée pendant une période de 10 jours consécutifs simultanément à des doses quotidiennes de TP (0,2 ou 0,4 mg/kg/j) administrées par injection sous-cutanée. Le programme de validation a montré que les doses de 0,2 ou 0,4 mg/kg/j de TP permettaient toutes deux la détection d'antiandrogènes et, par conséquent, il convient de choisir l'une des doses à utiliser dans l'essai. Des doses croissantes de la substance d'essai sont administrées à au moins 3 groupes d'animaux expérimentaux traités, à raison d'un niveau de dose par groupe. Les animaux sont autopsiés environ 24 heures après l'administration de la dernière dose. Une diminution statistiquement significative, par rapport aux groupes témoins ne recevant que du TP, du poids de deux organes cibles ou davantage dans les groupes de substance d'essai plus TP indique un résultat positif pour la substance d'essai en termes d'activité antiandrogénique potentielle (voir paragraphe 61).

▼M5

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Sélection de l'espèce et de la souche

17. Le rat est utilisé en routine dans le bioessai de Hershberger depuis les années 30. Sur le plan biologique, il est plausible que le rat et la souris présentent des réponses similaires, mais les 70 ans d'expérience avec le modèle de rat en font l'espèce de choix pour le bioessai de Hershberger. De surcroît, les données issues du bioessai pouvant servir de résultats préliminaires à une étude multigénérationnelle à long terme, il est ainsi possible d'utiliser dans les deux études des animaux de la même espèce, de la même souche et de la même source.

18. Ce mode opératoire remet aux laboratoires le soin de sélectionner la souche de rat à utiliser dans l'essai, qui sera en général celle habituellement employée dans le laboratoire concerné. On peut choisir les souches de rats de laboratoire couramment utilisées; toutefois, il faut éviter les souches dont la maturation est significativement plus longue que 42 jours, car une castration des mâles à 42 jours peut empêcher la mesure des poids de gland, qui ne peut être effectuée qu'après séparation du prépuce de la tige pénienne. Ainsi, on n'utilisera pas de souches dérivées du rat Fisher 344, sauf dans de rares cas. La chronologie du développement sexuel du rat Fisher 344 est différente de celle des autres souches couramment utilisées, telles que les souches Sprague Dawley ou Wistar (16). Dans le cas où une telle souche est utilisée, il conviendra de castrer les individus au laboratoire à un âge légèrement postérieur et il faudra démonter la sensibilité de la souche utilisée. La justification du choix d'une souche de rat est clairement établie par le laboratoire. Si l'essai de dépistage est préalable à une étude par voie orale à doses répétées, à une étude sur la reproduction et le développement ou à une étude à long terme, il conviendra d'utiliser de préférence des animaux issus de la même souche et de la même source dans toutes les études.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

19. Tous les modes opératoires respectent l'ensemble des normes locales en vigueur sur le soin des animaux de laboratoire. Les conditions d'entretien et de traitement décrites ici sont des normes minimales auxquelles se substituent des réglementations locales plus contraignantes, telles que la directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (26). La température du local expérimental est de 22 °C (à environ ± 3 °C). Le taux d'humidité relative est d'au moins 30 % et, de préférence, inférieur à 70 % en dehors des heures de nettoyage du local. On s'efforcera de maintenir l'humidité relative entre 50 et 60 %. L'éclairage est artificiel. La séquence d'éclairement est de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité.

20. Il est préférable de loger les animaux en groupes plutôt que de les isoler, en raison de leur jeune âge et parce que les rats sont des animaux sociaux. Le logement de deux ou trois animaux par cage évite la concentration et le stress qui lui est associé, susceptible d'interférer avec le contrôle hormonal du développement du tissu sexuel accessoire. Les cages seront soigneusement nettoyées afin d'en éliminer tous les contaminants possibles et placées de façon à réduire au minimum l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats. Le choix de cages de taille appropriée (~2 000 centimètres carrés) évitera le surpeuplement.

21. Chaque animal est identifié individuellement (par exemple par une marque ou une étiquette à l'oreille) en utilisant une méthode éthiquement acceptable. La méthode d'identification est consignée.

▼M5

22. Les animaux recevront de la nourriture et de l'eau potable à volonté. Les laboratoires qui mettent en œuvre le bioessai de Hershberger utilisent le régime alimentaire du laboratoire qui est normalement utilisé dans les études d'essais sur les produits chimiques. Lors des études de validation du bioessai, aucun effet ni variabilité attribuable au régime alimentaire n'a été observé. Le régime utilisé sera indiqué et un échantillon en sera conservé à des fins d'éventuelle analyse future.

Critères de performance relatifs aux poids des organes dépendant des androgènes

23. Au cours de l'étude de validation, aucune donnée n'a permis de démontrer qu'une diminution du poids corporel affectait les augmentations ou les réductions de croissance de poids des tissus cibles (c'est-à-dire des tissus qui doivent être pesés).

24. Les poids des organes dépendant des androgènes des différentes souches de rats utilisées avec succès dans le programme de validation sont plus élevés chez les souches de rats les plus lourdes que chez les souches plus légères. Par conséquent, les critères de performance du bioessai de Hershberger n'incluent pas les poids absolus prévisibles des organes pour les témoins positifs et négatifs.

25. Le coefficient de variation (CV) d'un tissu étant inversement proportionnel à la puissance statistique, les critères de performance du bioessai de Hershberger sont fondés sur des valeurs de CV maximales pour chaque tissu (tableau 1). Les CV sont tirés des études de validation de l'OCDE. Dans le cas de résultats négatifs, les laboratoires examinent les CV du groupe témoin et du groupe de traitement à dose élevée afin de déterminer si les critères de performance de CV maximal ont été dépassés.

26. L'étude est répétée dans les cas suivants: 1) trois ou plus des dix CV individuels possibles dans les groupes témoin et de traitement à dose élevée dépassent les valeurs maximales indiquées pour les études d'agonistes et d'antagonistes dans le tableau 1 et 2) au moins deux des tissus cibles sont marginalement non significatifs, c'est-à-dire présentent des valeurs ρ comprises entre 0,05 et 0,10.

Tableau 1

CV maximaux autorisés déterminés pour les tissus sexuels accessoires cibles dans le modèle sur rat castré dans les études de validation de l'OCDE ([1])

Tissu	Effets antiandrogéniques	Effets androgéniques
Vésicules séminales	40 %	40 %
Prostate ventrale	40 %	45 %
EABC	20 %	30 %
Glandes de Cowper	35 %	55 %
Gland	17 %	22 %

([1]) Le CV limite pour un tissu donné a été identifié à partir d'un graphe de valeurs de CV — reportées successivement de la plus petite à la plus grande — pour toutes les moyennes de toutes les expériences de l'étude de validation en utilisant un modèle spécifique (agoniste ou antagoniste). Le CV limite est lu au point auquel les incréments entre les CV les plus élevés suivants de la série sont largement plus grands que ceux qui séparent les quelques CV précédents, ou «point de rupture». Il convient de noter que même si cette analyse a identifié des «points de rupture» relativement fiables pour le modèle des antagonistes de l'essai, les courbes de CV pour l'essai des agonistes présentaient une augmentation plus uniforme et l'identification d'un CV limite par cette méthode est donc quelque peu arbitraire.

▼M5

MODE OPÉRATOIRE

Respect de la réglementation et vérification au laboratoire

27. Il est inutile de démontrer la compétence du laboratoire avant le début de l'étude pour l'essai de Hershberger comme c'est le cas pour l'essai utérotrophique (chapitre B.54 de la présente annexe), car des témoins positifs (propionate de testostérone et flutamide) et négatifs sont simultanément inclus dans l'essai.

Nombre et répartition des animaux

28. Chaque groupe d'essai et témoin comprend au moins 6 animaux. Cela s'applique aux protocoles androgéniques et antiandrogéniques.

Castration

29. Une période d'acclimatation initiale de plusieurs jours après réception des animaux attestera que les sujets sont sains et performants. Des animaux castrés avant l'âge de 42 jours ou au 42e jour postnatal (JPN) ne présentant pas toujours de séparation préputiale, il faut castrer les animaux au JPN 42 ou après, mais pas avant. Les animaux sont castrés sous anesthésie par incision dans le scrotum et prélèvement des testicules et de l'épididyme avec ligature des vaisseaux sanguins et des canalicules séminifères. Après confirmation de l'absence de saignement, le scrotum est refermé par des sutures ou des agrafes autoserrantes. Les animaux sont traités par des analgésiques pendant les quelques jours qui suivent l'intervention chirurgicale afin d'atténuer toute gêne postchirurgicale. Si les animaux sont acquis déjà castrés auprès d'un fournisseur d'animaux, celui-ci garantira leur âge et leur stade de maturité sexuelle.

Acclimatation après castration

30. Les animaux restent en acclimatation aux conditions de laboratoire pour permettre la régression des poids des tissus cibles pendant 7 jours au minimum après la castration. Ils sont observés quotidiennement, et tout animal présentant des signes de maladie ou d'anomalie physique est retiré. Ainsi, le début du traitement par administration des doses (à l'étude) peut commencer dès le 49e JPN, mais jamais après le 60e JPN. À l'autopsie, l'animal n'est pas âgé de plus de 70 JPN. Ce degré de flexibilité permet une programmation efficace du travail expérimental au laboratoire.

Poids corporel et randomisation des groupes

31. Les différences entre les poids corporels individuels représentent une source de variabilité entre les poids des tissus tant entre les groupes d'animaux qu'au sein de ces groupes. L'augmentation de la variabilité des poids des tissus se traduit par une augmentation du coefficient de variation (CV) et réduit la puissance statistique de l'essai (parfois aussi désignée par sensibilité de l'essai). Il convient par conséquent de limiter les variations du poids corporel au niveau expérimental ainsi qu'au niveau statistique.

32. Au niveau expérimental, il faut s'efforcer de réduire les variations de poids corporels au sein des groupes d'étude et entre eux. Tout d'abord, il convient d'écarter les animaux de taille anormalement grande ou petite et de ne pas les intégrer dans la cohorte de l'étude. Au début de l'étude, les variations de poids entre animaux ne dépassent pas ± 20 % du poids moyen (par exemple 175 g ± 35 g pour les rats péripubertaires castrés). En second lieu, il faut répartir les animaux au hasard dans les groupes (témoin et traités), de façon qu'il n'y ait aucune différence statistique de poids corporel moyen d'un groupe à l'autre. Le protocole de randomisation par blocs utilisé est consigné.

▼M5

33. La toxicité étant susceptible de réduire le poids corporel dans les groupes traités par rapport à celui du groupe témoin, il faut utiliser comme covariable statistique le poids corporel au premier jour d'administration de la substance de l'essai et non le poids corporel à l'autopsie.

Posologie

34. Afin d'établir si une substance d'essai peut avoir une action androgénique in vivo, il suffit généralement d'utiliser 2 groupes de dose de la substance d'essai auxquels s'ajoutent des témoins positifs et de véhicule (négatif) (voir paragraphe 43), et cette posologie est par conséquent préférée pour des raisons de bien-être animal. Si l'objectif est d'obtenir une courbe de la relation dose-effet ou d'extrapoler les résultats à des doses plus faibles, au moins 3 groupes de dose seront nécessaires. Si l'on souhaite obtenir des informations plus détaillées que la simple identification d'une activité androgénique (estimation de la puissance, par exemple), un autre régime posologique devra être envisagé. Si l'on cherche à tester des antiandrogènes, la substance d'essai est administrée en combinaison avec un agoniste d'androgène de référence. Il faut utiliser au moins 3 groupes d'essai avec différentes doses de la substance d'essai et un témoin positif et un témoin négatif (voir paragraphe 44). Exception faite de l'administration de la substance d'essai, les animaux du groupe témoin devront subir exactement le même traitement que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé pour administrer la substance d'essai, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé dans les groupes d'essai.

35. Tous les niveaux de dose sont proposés et sélectionnés à la lumière des données existantes sur la toxicité et le comportement (toxico)-cinétique de la substance d'essai ou de substances connexes. Le niveau de dose le plus élevé est établi tout d'abord en fonction de la DL50 et/ou des informations sur la toxicité aiguë afin d'éviter le décès et la détresse ou la souffrance extrêmes des animaux (17) (18) (19) (20) et, en second lieu, il convient de tenir compte des informations disponibles sur les doses utilisées dans des études subchroniques et chroniques. En général, la dose la plus élevée ne provoque pas de réduction du poids corporel final des animaux supérieure à 10 % du poids témoin. La dose la plus élevée est la plus haute dose qui assure la survie de l'animal et qui n'induit pas de toxicité ni de détresse significative au bout de 10 jours consécutifs d'administration jusqu'à une dose maximale de 1 000 mg/kg/jour (voir paragraphe 36), ou bien une dose inférieure induisant des effets (anti)androgéniques, quelle qu'elle soit. Pour un dépistage, de larges intervalles entre les doses sont acceptables, par exemple, une demi-unité logarithmique (soit un facteur de progression de 3,2) ou même une unité logarithmique. En l'absence de données appropriées, une étude préliminaire de détermination des doses (voir paragraphe 37) peut permettre de définir les doses qu'il convient d'utiliser.

Dose limite

36. Lorsque, dans un essai, la dose limite de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour et une dose inférieure dans le cadre des protocoles décrits par cette étude ne permetent pas de produire de changement statistiquement significatif des poids des organes reproducteurs, on peut considérer qu'il est inutile de tester d'autres niveaux de dose. Le concept de dose limite s'applique dans tous les cas, sauf lorsque des données d'exposition pour l'homme indiquent qu'il est nécessaire d'utiliser un niveau de dose plus élevé.

Détermination des doses

37. Le cas échéant, une étude préliminaire de détermination des doses peut être effectuée sur un petit nombre d'animaux afin de définir les groupes d'essai appropriés [par recours aux méthodes d'essai de la toxicité aiguë (chapitres B.1 bis, B.1 ter de la présente annexe (27), ligne directrice 425 de l'OCDE (19)]. L'objectif, dans le cas du bioessai de Hershberger, est de choisir des doses qui assurent la survie des animaux et n'entraînent pas de détresse ni

▼M5

d'effets toxiques graves après 10 jours consécutifs d'administration de la substance chimique, jusqu'à une dose maximale de 1 000 mg/kg/j, comme il est indiqué dans les paragraphes 35 et 36. À cet égard, le document d'orientation de l'OCDE (17) qui définit les signes cliniques indicateurs de toxicité ou de détresse des animaux peut être utilisé. Lorsque cela est possible dans le cadre de cette étude préliminaire de détermination des doses, après 10 jours d'administration, les tissus cibles peuvent être excisés et pesés environ 24 heures après administration de la dernière dose. Ces données peuvent ensuite contribuer à la sélection des doses dans l'étude principale.

Substances chimiques de référence et véhicule

38. L'agoniste d'androgènes de référence est le propionate de testostérone (TP), n° CAS 57-82-5. La dose de TP de référence peut être égale à 0,2 mg/kg de poids corporel/j ou bien à 0,4 mg/kg de poids corporel/j. L'antagoniste d'androgènes de référence est le flutamide (FT), n° CAS 1311-84-7. La dose de FT de référence est égale à 3 mg/kg de poids corporel/j et le FT est coadministré avec la dose de TP de référence.

39. Il est recommandé d'envisager d'utiliser, dans la mesure du possible, une solution ou une suspension aqueuse pour commencer. Toutefois, de nombreux ligands d'androgènes ou leurs précurseurs métaboliques sont plutôt hydrophobes, c'est pourquoi on utilise le plus souvent une solution ou une suspension dans l'huile (par exemple huile de maïs, d'arachide, de sésame ou d'olive). Les substances d'essai peuvent être dissoutes dans une quantité minimale d'éthanol à 95 % ou d'autres solvants appropriés, puis diluées dans le véhicule de l'essai aux concentrations finales de l'étude. Les caractéristiques toxiques du solvant sont connues et évaluées sur un groupe témoin séparé traité uniquement avec le solvant. Si la substance d'essai est considérée comme stable, on peut légèrement chauffer le mélange et le soumettre à une action mécanique vigoureuse pour faciliter sa dissolution. La stabilité de la substance d'essai dans le véhicule est déterminée. Si la substance d'essai est stable pendant toute la durée de l'étude, une fraction aliquote initiale de la substance d'essai peut être préparée, puis les dilutions spécifiées sont réalisées quotidiennement en prenant soin d'éviter la contamination et la détérioration des échantillons.

Administration des doses

40. Le TP est administré par injection sous-cutanée, et le FT par gavage oral.

41. La substance d'essai est administrée par gavage oral ou injection sous-cutanée. Il faut tenir compte du bien-être des animaux et des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai lors du choix de la voie d'administration. De surcroît, il convient de considérer les aspects toxicologiques comme l'adéquation à la voie d'exposition de l'homme à la substance chimique (gavage oral pour représenter une exposition par ingestion, injection sous-cutanée pour une exposition par inhalation ou adsorption cutanée), les informations toxicologiques existantes et les données sur le métabolisme et la cinétique (par exemple la nécessité d'éviter le métabolisme de premier passage, meilleure efficacité d'une des voies d'administration), avant de mettre en œuvre un essai approfondi à long terme lorsque des résultats positifs sont obtenus par injection.

42. Il faut administrer les doses aux animaux de la même manière et avec la même séquence temporelle pendant 10 jours consécutifs à des intervalles d'environ 24 heures. Le niveau de dose est ajusté tous les jours en se fondant sur les mesures quotidiennes simultanées de poids corporel. Le volume de dose et le moment auquel elle est administrée sont notés chaque jour d'exposition. Il importe de veiller à ne pas dépasser la dose maximale mentionnée au paragraphe 35 pour pouvoir interpréter avec profit les données. La réduction du poids corporel, les signes cliniques et les autres données observées devront être soigneusement évalués dans cette perspective. Dans le cas d'un gavage oral, il faut utiliser une sonde gastrique

▼M5

ou une canule d'intubation appropriée. Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal expérimental. Les directives locales de soins aux animaux sont observées, mais le volume n'excède pas 5 ml/kg de poids corporel, sauf dans le cas de solutions aqueuses où l'on pourra utiliser 10 ml/kg de poids corporel. Dans le cas d'injections sous-cutanées, les doses sont injectées dans la région dorso-scapulaire ou lombaire à l'aide d'une aiguille stérile (de calibre 23 ou 25) et d'une seringue de tuberculination. Le rasage du site d'injection est facultatif. Toute perte ou fuite au site de l'injection ou toute administration incomplète sont consignées. Le volume total injecté par rat par jour ne dépasse pas 0,5 ml/kg de poids corporel.

Mode opératoire spécifique pour les agonistes d'androgènes

43. Dans les essais d'agonistes d'androgènes, le véhicule est le témoin négatif et le groupe traité par TP est le témoin positif. L'activité biologique correspondant aux agonistes d'androgènes est testée par administration d'une substance d'essai à des groupes de traitement aux doses choisies pendant 10 jours consécutifs. Les poids des cinq tissus sexuels accessoires des groupes recevant la substance d'essai sont comparés à ceux du groupe recevant le véhicule afin de déterminer des augmentations pondérales statistiquement significatives.

Modes opératoires spécifiques pour les antagonistes d'androgènes et les inhibiteurs de 5α-réductase

44. En ce qui concerne les essais d'antagonistes d'androgènes et d'inhibiteurs de 5α-réductase, le groupe traité par TP joue le rôle de témoin négatif et le groupe recevant des doses de référence de TP et de FT coadministrées celui de témoin positif. L'activité biologique correspondant aux antagonistes d'androgènes et aux inhibiteurs de 5α-réductase est analysée par administration d'une dose de référence de TP et administration de la substance d'essai pendant 10 jours consécutifs. Les poids des cinq tissus sexuels accessoires des groupes recevant du TP plus la substance d'essai sont comparés à ceux du groupe ne recevant que TP de référence afin de déterminer des diminutions des poids statistiquement significatives.

OBSERVATIONS

Observations cliniques

45. Des observations cliniques générales sont effectuées au moins une fois par jour et plus fréquemment si des signes de toxicité sont constatés. Il faut les conduire de préférence chaque jour à la (aux) mêmes(s) heure(s) et en tenant compte des prévisions des maxima d'effets après l'administration des doses. La mortalité, la morbidité et les signes cliniques généraux tels que les changements de comportement, les modifications de la peau, du pelage, des yeux et des muqueuses, l'apparition de sécrétions et d'excrétions et les activités végétatives (larmoiement, piloérection, taille des pupilles, respiration inhabituelle, par exemple) sont détectées sur tous les animaux.

46. Tous les animaux décédés sont retirés et éliminés sans autre analyse de résultat. La mortalité des animaux avant l'autopsie de quelque nature que ce soit est incluse dans le dossier de l'étude ainsi que toutes les raisons apparentes de mortalité. Tous les animaux moribonds sont humainement sacrifiés. Tous les animaux moribonds et sacrifiés par la suite sont inclus dans le dossier de l'étude avec les causes apparentes de morbidité.

▼M5

Poids corporel et consommation alimentaire

47. Tous les animaux sont pesés quotidiennement à 0,1 g près, en commençant juste avant le début du traitement c'est-à-dire au moment de la répartition des animaux dans les groupes. La quantité de nourriture consommée durant la période de traitement peut éventuellement être mesurée cage par cage en pesant les distributeurs d'aliments. Ces données sur la consommation alimentaire sont exprimées en grammes par rat par jour.

Dissection et mesure des poids des tissus et des organes

48. Environ 24 heures après la dernière administration de la substance d'essai, les rats sont sacrifiés et exsanguinés conformément aux protocoles habituels du laboratoire réalisant l'étude, puis l'autopsie est effectuée. La méthode humaine de sacrifice est consignée dans le rapport du laboratoire.

49. Dans l'idéal, l'ordre dans lequel les groupes d'animaux sont autopsiés est aléatoire et ne suit pas l'ordre de croissance ou de décroissance des doses, ce qui pourrait affecter les données. Toutes les observations effectuées lors de l'autopsie, notamment les modifications pathologiques et les lésions visibles sont notées et consignées.

50. Les cinq tissus dépendant des androgènes (PV, VS, EABC, COW, G) font l'objet de mesures. Ces tissus sont excisés, soigneusement débarrassés des tissus et des graisses adhérents en excès, et leurs poids frais (non fixé) est déterminé. Chaque tissu est manipulé avec un soin particulier afin d'éviter la perte de fluide et la dessiccation, susceptibles d'introduire des erreurs significatives et une variabilité par réduction des poids consignés. Certains tissus peuvent être très petits ou difficiles à disséquer, ce qui est source de variabilité. Par conséquent, il est important que les modes opératoires de dissection standard utilisés pour les tissus sexuels accessoires soient bien maîtrisés par les personnes chargées de cette tâche. Un manuel de modes opératoires normalisés pour la dissection est disponible auprès de l'OCDE (21). Une formation poussée basée sur le guide de modes opératoires normalisés limitera une source de variation potentielle dans l'étude. Dans l'idéal, le même prosecteur sera chargé de la dissection d'un tissu donné afin d'éliminer les différences de traitement des tissus propres aux individus. Si cette approche s'avère impossible, le programme d'autopsie est conçu de façon que chaque prosecteur dissèque un tissu donné de tous les groupes de traitement, et non pas tous les tissus d'un groupe témoin, tandis qu'un autre est responsable des groupes traités. Chaque tissu sexuel accessoire est pesé sans essuyage préalable à 0,1 mg près, et les poids sont notés pour chaque animal.

51. Certains tissus sont très petits ou difficiles à disséquer, ce qui est source de variabilité. Des études précédentes ont indiqué un intervalle de coefficients de variation (CV) qui se révèle différent selon les compétences du laboratoire. Dans quelques cas, de grandes différences entre les poids absolus de tissus tels que la PV et les COW ont été observées au sein d'un laboratoire particulier.

52. Les mesures de poids du foie, de la paire de reins et de la paire de glandes surrénales sont facultatives. Ces tissus sont également débarrassés de tous les fascias et graisses adhérents. Le foie est pesé et la mesure consignée à 0,1 g près et la paire de reins et la paire de glandes surrénales sont pesées et les mesures consignées à 0,1 mg près. Le foie, le rein et les glandes surrénales ne sont pas influencés uniquement par les androgènes; ils fournissent également des indices utiles sur la toxicité systémique.

▼**M5**

53. La mesure des teneurs sériques en hormone lutéinisante (LH), en hormone folliculo-stimulante (FSH) et en testostérone (T) est facultative. Les teneurs sériques en testostérone sont utiles pour déterminer si la substance de l'essai induit un métabolisme hépatique de la testostérone, susceptible de réduire les teneurs sériques. Si l'on ne dispose pas des données concernant la testostérone, cet effet pourrait paraître imputable à un mécanisme antiandrogénique. Les teneurs en LH livrent des informations sur la capacité d'un antiandrogène à réduire les poids des organes, mais également sur son aptitude à affecter la fonction hypothalamique-pituitaire, qui, dans les études à long terme, peut induire des tumeurs des testicules. La FSH est une hormone importante pour la spermatogénèse. La mesure des teneurs sériques en T4 et T3 est également facultative et peut fournir des informations additionnelles utiles sur la capacité à rompre l'homéostase de l'hormone thyroïdienne. En vue d'obtenir des mesures des teneurs en hormones, il faut anesthésier les rats avant l'autopsie et prélever du sang par ponction cardiaque, le procédé d'anesthésie étant choisi avec soin afin qu'il n'affecte pas la mesure des hormones. La méthode de préparation du sérum, la source des kits d'essai radio-immunologique ou d'autres techniques de mesure, les protocoles analytiques et les résultats sont consignés. Les teneurs en LH ainsi que les teneurs en testostérone sont notées en ng/ml de sérum.

54. La description de la dissection des tissus est basée sur un guide de dissection détaillé qui contient des photographies et est publié sous forme de supplément intégré au programme de validation (21). La page web de la Food and Drug Administration coréenne propose également une vidéo présentant la dissection (22).

— La surface ventrale de l'animal tournée vers le haut, déterminer si le prépuce du pénis s'est séparé du gland. Si c'est le cas, rétracter le prépuce et retirer le gland, le peser (à 0,1 mg près), et noter le poids.

— Ouvrir la peau et la paroi abdominales, en exposant les viscères. S'il faut peser les organes facultatifs, prélever et peser le foie à 0,1 g près, prélever l'estomac et les intestins, prélever et peser à 0,1 mg près la paire de reins et la paire de glandes surrénales. Cette dissection expose la vessie et initie la dissection des tissus accessoires mâles cibles.

— Afin de disséquer la PV, séparer la vessie de la couche musculaire ventrale en découpant le tissu conjonctif le long de la ligne médiane. Déplacer la vessie dans la direction antérieure vers les vésicules séminales (VS), en découvrant les lobes gauche et droit de la prostate ventrale (recouverts d'une couche de graisse). Gratter soigneusement la graisse des lobes droit et gauche de la PV. Écarter doucement le lobe droit de la PV de l'urètre et disséquer le lobe de l'urètre. Tout en maintenant toujours le lobe droit de la PV, écarter doucement le lobe gauche de la PV de l'urètre puis le disséquer; peser à 0,1 mg près et noter le poids.

— Afin de disséquer la vésicule séminale plus les glandes coagulantes (VSGC), déplacer la vessie en direction caudale, exposer le canal déférent et les lobes droit et gauche des VSGC. Empêcher la fuite du fluide par clampage d'une pince hémostatique à la base des VSGC, au point où le canal déférent rejoint l'urètre. Disséquer soigneusement les VSGC, en maintenant la pince hémostatique en place, retirer la graisse et les annexes, les placer dans une coupelle de pesée tarée, retirer la pince hémostatique et peser à 0,1 mg près, puis noter le poids.

▼M5

— Afin de disséquer les muscles élévateurs de l'anus et bulbo-caverneux (EABC), les muscles et la base du pénis sont exposés. Les muscles EA enveloppent le colon, tandis que les muscles EA antérieur et BC sont attachés aux bulbes péniens. La peau et les annexes de la région périanale qui s'étendent de la base du pénis jusqu'à l'extrémité antérieure de l'anus sont retirés. Les muscles BC sont progressivement disséqués du bulbe pénien et des tissus. Le colon est coupé en deux, et la totalité de l'EABC peut être disséquée et retirée. L'EABC est débarrassé des graisses et des annexes, pesé à 0,1 mg près, puis le poids est noté.

— Après retrait de l'EABC, les glandes de Cowper ou bulbo-urétrales (COW) rondes sont visibles à la base des bulbes péniens et en position légèrement dorsale. Il est nécessaire de procéder à une dissection soigneuse pour éviter de couper la capsule mince et empêcher toute fuite de fluide. Peser la paire de COW à 0,1 mg près et noter le poids.

— En outre, lorsque du fluide s'échappe d'une glande quelle qu'elle soit au cours de l'autopsie et de la dissection, cette perte est consignée.

55. Si l'évaluation de chaque substance chimique nécessite d'autopsier davantage d'animaux qu'il n'est raisonnable en un seul jour, le début de l'étude est échelonné sur 2 jours consécutifs, ce qui permettra d'échelonner l'autopsie et les tâches afférentes sur 2 jours. Dans ce type de répartition, il convient d'utiliser la moitié des animaux d'un groupe de traitement par jour.

56. Les carcasses sont éliminées d'une manière appropriée après l'autopsie

RAPPORT

Données

57. Les données sont consignées individuellement (à savoir poids corporel, poids des tissus sexuels accessoires, mesures facultatives et autres réponses et observations) et pour chaque groupe d'animaux (les moyennes et écarts types de toutes les mesures sont relevés). Les résultats sont résumés sous forme de tableaux faisant apparaître le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou présentant des signes de toxicité, et une description de ces signes, notamment le moment de leur apparition, leur durée et leur gravité.

58. Le rapport final contient les informations suivantes:

Établissement réalisant l'essai

— Nom de l'établissement, adresse

— Directeur de l'étude et autres membres du personnel ainsi que leur responsabilité dans l'étude

— Dates de début et de fin de l'étude, c'est-à-dire premier jour d'administration de la substance d'essai et dernier jour de l'autopsie, respectivement

Substance d'essai

— Source, numéro de lot, identité, pureté, adresse complète du fournisseur et caractérisation de la ou des substances d'essai

— Nature physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques

— Conditions de stockage et méthode et fréquence de préparation de la dilution

— Données obtenues sur la stabilité, quelles qu'elles soient

— Analyses des solutions/suspensions administrées, quelles qu'elles soient

▼**M5**

Véhicule

— Caractérisation du véhicule (identité, fournisseur et numéro de lot)

— Justification du choix du véhicule (s'il ne s'agit pas d'eau)

Animaux expérimentaux et protocoles d'élevage des animaux

— Espèce/souche utilisée et justification du choix

— Source ou fournisseur des animaux, comprenant l'adresse complète

— Nombre et âge des animaux fournis

— Conditions d'hébergement (température, éclairage, etc.)

— Régime alimentaire (nom, type, fournisseur, numéro de lot, contenu et si elles sont connues, teneurs en phytœstrogènes)

— Litière (nom, type, fournisseur, contenu)

— Conditions de logement en cage et nombre d'animaux par cage

Conditions de l'essai

— Âge à la castration et durée de l'acclimatation après castration

— Poids de chaque animal au début de l'étude (à 0,1 g près)

— Procédé de randomisation et répartition dans les groupes de véhicule, de référence, de substance d'essai, et dans les cages

— Moyenne et écart type des poids corporels dans chaque groupe chaque jour de pesée pendant toute l'étude

— Justification du choix des doses

— Voie d'administration de la substance d'essai et justification du choix de la voie d'exposition

— S'il s'agit d'un essai pour déterminer l'antiandrogénicité, traitement par TP (dose et volume)

— Traitement par la substance d'essai (dose et volume)

— Moment d'administration

— Modes opératoires d'autopsie, notamment moyens d'exsanguination et toutes les anesthésies

— Dans le cas d'analyses du sérum, les détails de la méthode sont consignés. Par exemple, si l'on utilise un RIA, le mode opératoire de RIA, la source des kits de RIA, les dates d'expiration des kits, le mode opératoire de comptage par scintillation et l'étalonnage sont consignés.

Résultats

— Observations quotidiennes de chaque animal pendant l'administration de la dose, notamment:

— Poids corporels (à 0,1 g près)

— Signes cliniques (le cas échéant)

— Mesures ou notes sur la consommation d'aliments

— Observations à l'autopsie de chaque animal, notamment:

▼M5

— Date de l'autopsie

— Groupe de traitement de l'animal

— ID de l'animal

— Prosecteur

— Moments de la journée auxquels sont réalisées l'autopsie et la dissection

— Âge de l'animal

— Poids corporel final à l'autopsie, en notant toute augmentation ou diminution statistiquement significative

— Ordre d'exsanguination et de dissection des animaux à l'autopsie

— Poids des cinq tissus cibles dépendant des androgènes:

— Prostate ventrale (à 0,1 mg près)

— Vésicules séminales plus glandes coagulantes, y compris les fluides (par paires à 0,1 mg près)

— Complexe des muscles élévateurs de l'anus et bulbo-caverneux (à 0,1 mg près)

— Glandes de Cowper (poids frais, par paires, à 0,1 mg près)

— Gland (poids frais à 0,1 mg près)

— Poids des tissus facultatifs, s'ils ont été mesurés:

— Foie (à 0,1 mg près)

— Reins (par paires à 0,1 mg près)

— Glandes surrénales (par paires à 0,1 mg près)

— Remarques générales et commentaires

— Analyse des hormones sériques, le cas échéant

  — LH sérique (facultatif — ng/ml de sérum) et

  — T sérique (facultatif — ng/ml de sérum)

— Remarques générales et commentaires

Résumé des données

Les données sont résumées sous forme de tableaux contenant la taille de l'échantillon pour chaque groupe, la moyenne de la valeur, et l'erreur type de la moyenne ou l'écart type. Les tableaux comprennent les poids corporels à l'autopsie, les variations du poids corporel entre le début de l'administration de la substance et l'autopsie, les poids des tissus sexuels accessoires cibles et tous les poids d'organes facultatifs.

Discussion des résultats

Analyse des résultats

59. Les poids du corps et des organes à l'autopsie font l'objet d'une analyse statistique afin de déterminer des paramètres tels que l'homogénéité de la variance, à l'aide de transformations appropriées des données, selon les besoins. Les groupes de traitement sont comparés à un groupe témoin en utilisant des techniques telles que le test ANOVA, suivi de comparaisons par paires (par exemple test unilatéral de Dunnett) et les critères de différence statistique, par exemple $p \leq 0,05$. Les groupes présentant une signification statistique sont identifiés. Néanmoins, il faut éviter les poids d'organe relatifs, car les hypothèses statistiques qui fondent cette manipulation de données sont invalides.

▼M5

60. En ce qui concerne l'agonisme des androgènes, le témoin est constitué du groupe d'essai recevant seulement le véhicule. Les caractéristiques du mode d'action d'une substance d'essai peuvent provoquer des réponses relatives différentes selon les tissus, par exemple, la trenbolone, qui ne peut être réduite en position 5α, exerce des effets plus prononcés sur l'EABC et le G que le TP. Une augmentation statistiquement significative ($p \leq 0,05$) de deux des cinq poids de tissus dépendant des androgènes cibles ou plus (VP, EABC, G, GC et VSGC) peut être considérée comme un résultat positif d'agoniste d'androgènes, et tous les tissus cibles doivent alors présenter un degré quelconque d'augmentation de croissance. L'évaluation combinée de toutes les réponses de tissus d'organes sexuels annexes peut être réalisée au moyen d'une analyse de données multivariées appropriée. L'analyse peut ainsi être affinée, en particulier dans les cas où un seul tissu donne une réponse statistiquement significative.

61. Pour étudier l'antagonisme des androgènes, le témoin est constitué du groupe d'essai avec l'androgène de référence (propionate de testostérone seulement). Les caractéristiques du mode d'action d'une substance d'essai peuvent aboutir à des réponses relatives différentes entre les tissus, par exemple les inhibiteurs de 5α-réductase, comme le finastéride, exercent des effets plus prononcés sur la prostate ventrale que sur d'autres tissus par rapport à des antagonistes de RA puissants, comme le flutamide. Une réduction statistiquement significative ($p \leq 0,05$) de deux des cinq poids de tissus dépendant des androgènes cibles ou plus (VP, EABC, G, GC et V SGC) par rapport au traitement par TP seul peut être considérée comme un résultat positif d'antagoniste d'androgènes, et tous les tissus cibles doivent alors présenter une réduction de croissance à un degré quelconque. L'évaluation combinée de toutes les réponses de tissus d'organes sexuels annexes peut être réalisée au moyen d'une analyse de données multivariées appropriée. L'analyse peut ainsi être affinée, en particulier dans les cas où un seul tissu donne une réponse statistiquement significative.

62. Les données seront résumées sous forme de tableaux contenant la moyenne, l'erreur type de la moyenne (l'écart type est également acceptable) et la taille d'échantillon pour chaque groupe. Des tableaux de données individuelles devront également être inclus. Les valeurs individuelles, la moyenne, l'erreur type (écart type) et les valeurs de CV des résultats du témoin devront être examinées afin de déterminer si elles respectent les critères acceptables de cohérence avec les valeurs historiques attendues. Si les CV sont supérieures aux valeurs de CV indiquées dans le tableau 1 (voir paragraphe 25 et 26), il faudra déterminer, pour chaque poids d'organe, si des erreurs entachent l'enregistrement ou l'entrée des données ou si le laboratoire ne maîtrise pas encore la dissection soignée des tissus dépendant des androgènes et si un complément de formation ou de pratique serait justifié. Habituellement, les CV (écart type divisé par poids moyen de l'organe) sont reproductibles d'un laboratoire à l'autre et d'une étude à l'autre. Les données présentées incluent au moins les poids de prostate ventrale, de vésicule séminale, de muscles élévateurs de l'anus et bulbo-caverneux, des glandes de Cowper, du gland, du foie et les poids corporels ainsi que la variation de poids corporel entre le début de l'administration des doses et l'autopsie. Les données peuvent également être présentées après ajustement de covariance du poids corporel, mais sans omettre la présentation des données non ajustées. De surcroît, s'il n'y a pas séparation préputiale dans l'un quelconque des groupes, l'incidence de la séparation est notée et statistiquement comparée au groupe témoin en utilisant un test exact de Fisher.

▼**M5**

63. Lors de la vérification des entrées des résultats dans l'ordinateur par comparaison aux fiches de résultats originelles afin d'en déterminer la précision, les valeurs de poids d'organes qui ne sont pas biologiquement plausibles ou varient de plus de trois écarts types par rapport à celles du groupe de traitement sont minutieusement examinées, et il faudra peut-être les rejeter comme étant vraisemblablement des erreurs de relevés.

64. La comparaison des résultats de l'étude avec les valeurs de CV de l'OCDE (dans le tableau 1) représente souvent une étape importante de l'interprétation en termes de validité des résultats de l'étude. Les données historiques concernant les groupes témoins qui ont reçu le véhicule sont conservées au laboratoire. Les données historiques concernant les réponses à des substances de référence positives, telles que TP et FT, sont également conservées au laboratoire. Les laboratoires peuvent de surcroît tester périodiquement la réponse à des agonistes et à des antagonistes d'androgènes faibles connus et conserver ces résultats. Ces données peuvent être comparées aux données dont dispose l'OCDE pour s'assurer que les méthodes du laboratoire présentent une précision statistique et une puissance statistique suffisantes.

▼**M5**

Appendice 1

DÉFINITIONS

Androgénique: terme utilisé pour décrire une influence positive sur la croissance des tissus dépendant des androgènes.

Antiandrogénique: capacité d'une substance chimique à supprimer l'action de TP dans un organisme de mammifère.

Date de naissance: jour 0 après la naissance.

Dose: quantité de substance d'essai administrée. Dans le bioessai de Hershberger, la dose est exprimée en poids de substance d'essai par unité de poids corporel de l'animal expérimental par jour (mg/kg de poids corporel/jour).

Posologie: terme général recouvrant la dose, la fréquence d'administration et la durée d'administration.

Moribond: terme utilisé pour décrire un animal en train de mourir, c'est-à-dire proche de la mort.

Jour postnatal X: Xe jour de vie après le jour de la naissance.

Sensibilité: capacité d'une méthode d'essai à identifier correctement des substances chimiques dont la propriété est testée.

Spécificité: capacité d'une méthode d'essai à identifier correctement des substances chimiques qui n'ont pas la propriété testée.

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

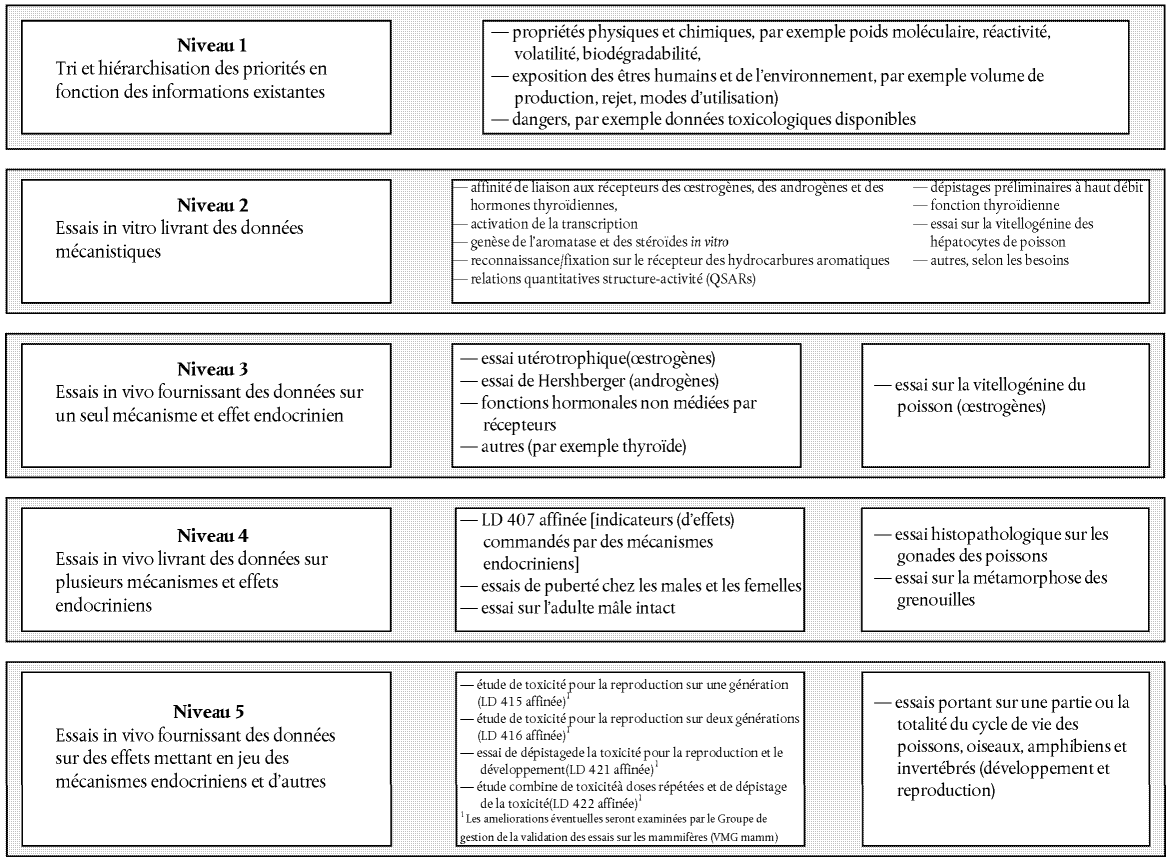
Validation: procédé scientifique destiné à caractériser les conditions et les limites opératoires d'une méthode d'essai et à démontrer sa fiabilité et sa pertinence dans un objectif particulier.

▼M5

Appendice 2

Note: Document prepare par le secretariat du programme sur les lignes directrices à partir de l'accord conclu à la 6e reunion du groupe d'étude sur l'essai et l'évaluation des perturbateurs endocriniens (EDTA)

Cadre conceptuelde l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens



NOTES SE RAPPORTANT AU CADRE CONCEPTUEL

02008R0440 — FR — 16.10.2019 — 008.001 — 934

▼**M5**

NOTES SE RAPPORTANT AU CADRE CONCEPTUEL

Note 1: Il est possible d'entrer dans le cadre et d'en sortir à tous les niveaux, suivant la nature des informations nécessaires à des fins d'évaluation des dangers et des risques.

Note 2: Le niveau 5 relatif à l'écotoxicologie devrait inclure des indicateurs mettant en évidence le mode d'action des effets néfastes et d'éventuels dégâts au niveau des populations.

Note 3: S'il existe un modèle multimodal couvrant plusieurs des essais fournissant des données sur un seul indicateur, ce modèle remplace ces essais.

Note 4: L'évaluation de chaque substance chimique est à effectuer au cas par cas, à la lumière de toutes les informations disponibles et compte tenu de la fonction des niveaux du cadre.

Note 5: La version actuelle du cadre ne doit pas être considérée comme exhaustive. Aux niveaux 3, 4 et 5, elle inclut des essais déjà disponibles ou en cours de validation. Ces derniers sont provisoirement inclus; ils seront confirmés une fois mis au point et validés.

Note 6: La portée des essais du niveau 5 n'est pas strictement limitée. Les essais incorporés à ce niveau servent à l'évaluation des dangers et des risques.

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (1988), Rapport de la première réunion du Groupe d'étude de l'OCDE sur l'essai et l'évaluation des perturbateurs endocriniens (EDTA), 10 et 11 mars 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) Dorfman, R.I. (1962), Standard Methods Adopted by Official Organization, Academic Press, NY.

(3) Gray, L.E. Jr, Furr, J., et Ostby, J.S. (2005), Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats, in Current Protocols in Toxicology, 16.9.1-16.9.15, J. Wiley and Sons Inc.

(4) OCDE (2006), Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide, Environmental Health and Safety, Monograph, Series on Testing and Assessment, No. 62, ENV/JM/MONO(2006)30.

(5) OCDE (2008), Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5a-Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories, Environmental Health and Safety, Monograph, Series on Testing and Assessment, No. 86, ENV/JM/MONO(2008)3.

(6) OCDE (2007), Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol, Environmental Health and Safety, Monograph, Series on Testing and Assessment, No. 73, ENV/JM/MONO(2007)20.

(7) Owens, W., Zeiger, E., Walker, M., Ashby, J., Onyon, L., et Gray, L.E. Jr (2006), The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol, Env. Health Persp., 114:1265-1269.

▼**M5**

(8) Owens, W., Gray, L.E., Zeiger, E., Walker, M., Yamasaki, K., Ashby, J., Jacob, E. (2007), The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies, Environ. Health Perspect., 115(5):671-8.

(9) Korenchevsky, V. (1932), The assay of testicular hormone preparations, Biochem. J., 26:413-422.

(10) Korenchevsky, V., Dennison, M., et Schalit, R. (1932), The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone, Biochem. J., 26:1306-1314.

(11) Eisenberg, E., et Gordan, G.S. (1950), The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones, J. Pharmacol. Exp. Therap., 99:38-44.

(12) Eisenberg, E., Gordan, G.S., et Elliott, H.W. (1949), Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for mytrophic activity, Endocrinology, 45:113-119.

(13) Hershberger, L., Shipley, E., et Meyer, R. (1953), Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 83:175-180.

(14) Hilgar, A.G., et Vollmer, E.P. (1964), Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic, Washington DC: United States Public Health Service.

(15) Dorfman, R.I. (1969), Androgens and anabolic agents, in Dorfman, R.I. (ed) Methods in Hormone Research, volume IIA, New York, Academic Press, 151-220.

(16) Massaro, E.J. (2002), Handbook of Neurotoxicology, volume I, New York, Humana Press, p. 38.

(17) OCDE (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et évaluations, n° 19, ENV/JM/MONO(2000)7.

(18) OCDE (1982), Organisation de coopération et de développement économiques — Principes de l'OCDE relatifs aux bonnes pratiques de laboratoire, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

(19) OCDE (2008), Toxicité orale aiguë — Méthode de l'ajustement des doses. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques n° 425.

(20) OCDE (2001), Document d'orientation sur les essais de toxicité orale aiguë, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et évaluations, n° 24, ENV/JM/MONO(2001)4.

(21) Supplemental materials for Owens e.a. (2006), The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol, Env. Health Persp., 114:1265-1269. Voir section II, 'The dissection guidance provided to the laboratories': http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf

(22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video, http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education fr.html

(23) OCDE (2008), Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay, Environmental Health and Safety, Monograph, Series on Testing and Assessment, No. 90, ENV/JM/MONO(2008)17.

(24) OCDE (2008), Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.

(25) OCDE (2009), Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties, Series on Testing and Assessment, No. 115.

▼**M5**

(26) Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifques (JO L 276 du 20.10.2010, p. 33).

(27) Les chapitres suivants de la présente annexe:

B.1 bis, Toxicité orale aiguë — Méthode de la dose prédéterminée

B.1 ter, Toxicité orale aiguë — Méthode de la classe de toxicité aiguë

▼M5

B.56. ÉTUDE ETENDUE DE TOXICITE POUR LA REPRODUCTION SUR UNE GENERATION

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice pour les essais de produits chimiques n° 443 (2012) de l'OCDE. Elle s'appuie sur un projet d'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération F1 réalisée au cours des différents stades de la vie, proposé par le comité technique ACSA (Agricultural Chemical Safety Assessment) du Health and Environmental Sciences Institute (HESI) de l'ILSI (Institut international Life Science Institute), tel que publié dans Cooper e.a., 2006 (1). Plusieurs améliorations et clarifications ont été apportées à la méthodologie de l'étude afin de la rendre adaptable et de mettre en valeur l'importance de s'appuyer sur les connaissances existantes, tout en mettant à profit les observations en cours d'étude pour orienter et développer l'essai. La présente méthode d'essai fournit une description détaillée du mode opératoire de l'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération. Elle décrit trois cohortes d'animaux de génération F1:

   cohorte 1: évaluation des effets observés sur la reproduction/le développement; cette cohorte peut ensuite être étendue à des animaux de génération F2,

   cohorte 2: évaluation de l'impact potentiel de l'exposition aux produits chimiques sur le développement du système nerveux,

   cohorte 3: évaluation de l'impact potentiel de l'exposition aux produits chimiques sur le développement du système immunitaire.

2. Il convient que les décisions d'étendre l'évaluation à une deuxième génération et d'exclure les cohortes servant à déterminer la neurotoxicité pour le développement et/ou l'immunotoxicité pour le développement soient prises sur la base des connaissances existantes concernant la substance d'essai, ainsi que des impératifs fixés par différentes autorités réglementaires. La présente méthode d'essai vise à détailler la manière dont l'étude peut être menée et dont il convient d'évaluer les diverses cohortes.

3. La procédure étayant la décision de déclencher en cours d'étude la production d'une seconde génération est décrite dans le document d'orientation n° 117 de l'OCDE (39) à l'intention des autorités réglementaires recourant aux déclencheurs internes.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET OBJECTIFS

4. L'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération vise principalement à évaluer les étapes de la vie non couvertes par les autres types d'études de toxicité et à examiner les effets potentiels d'une exposition pré- et postnatale aux produits chimiques. Pour mesurer les effets sur la reproduction, on songera d'abord à utiliser, s'ils sont disponibles, les résultats d'études à doses répétées [notamment études de dépistage de la toxicité pour la reproduction, comme la ligne directrice 422 de l'OCDE (32)], ou d'essais de dépistage à court terme des perturbateurs endocriniens, [par exemple bioessai utérotrophique — méthode d'essai B.54 (36); bioessai de Hershberger, méthode d'essai B.55 (37)] pour mettre en évidence un impact sur les organes reproducteurs mâles et femelles. Ces résultats porteront par exemple sur la spermatogenèse (examen histopathologique des testicules) chez les mâles et sur les cycles œstraux, la numération des follicules/maturation des ovocytes et l'intégrité des ovaires (examen histopathologique) chez les femelles. L'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération permet donc d'examiner les effets sur la reproduction à partir d'interactions entre mâles et femelles, entre femelles et conceptus, et entre femelles et descendants et sur la génération F1 après la maturité sexuelle [voir document d'orientation n° 151 en appui à la présente méthode d'essai (40)].

▼**M5**

5. La présente méthode d'essai est élaborée en vue de permettre l'évaluation des effets pré- et postnataux de produits chimiques sur le développement, ainsi que l'examen exhaustif de la toxicité systémique chez les femelles gravides et allaitantes et chez la descendance (petits et adultes). L'examen détaillé des principaux effets sur le développement, comme la viabilité de la descendance, la santé des nouveau-nés, le niveau de développement à la naissance et le développement physique et fonctionnel jusqu'à l'âge adulte, doit permettre de repérer les organes cibles spécifiques chez les descendants. En outre, l'étude fournira et/ou confirmera des informations quant aux effets de la substance d'essai sur l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâles et femelles chez l'adulte. On tiendra notamment compte des paramètres suivants, sans s'y limiter: fonction gonadique, cycle œstral, maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme, comportement d'accouplement, conception, gestation, mise bas et lactation. Par ailleurs, les résultats de l'évaluation de la neurotoxicité pour le développement et de l'immunotoxicité pour le développement caractériseront les effets potentiels sur ces systèmes. Les données découlant de ces essais devront permettre de déterminer les concentrations sans effet nocif observé (CSENO), les concentrations minimales avec effet nocif observé (CMENO) et/ou les doses de référence pour les divers effets évalués, et/ou servir à caractériser les effets repérés dans des études à doses répétées antérieures et/ou à orienter les essais ultérieurs.

6. Le protocole est représenté schématiquement à la figure 1. La substance d'essai est administrée en continu à plusieurs groupes de mâles et femelles sexuellement matures, à différentes doses échelonnées suivant une gradation. Cette génération parentale (P) reçoit la substance pendant un temps défini avant l'accouplement (période fixée d'après les informations disponibles sur la substance d'essai, mais ne pouvant pas être inférieure à 2 semaines) puis pendant une période d'accouplement de 2 semaines. Les mâles P sont ensuite traités au moins jusqu'au sevrage de la génération F1. Leur traitement dure au minimum 10 semaines et peut être prolongé s'il y a lieu de clarifier les effets sur la reproduction. Le traitement des femelles P se poursuit pendant la gestation et l'allaitement jusqu'au sacrifice, après le sevrage de leurs portées (soit 8 à 10 semaines de traitement). La descendance F1 reçoit encore la substance d'essai du sevrage jusqu'à l'âge adulte. En cas d'évaluation d'une seconde génération [voir document d'orientation n° 117 de l'OCDE (39)], la descendance F1 continue de recevoir le traitement jusqu'au sevrage des petits F2, ou jusqu'à la fin de l'étude.

7. Tous les animaux subissent un examen clinique et pathologique destiné à mettre en évidence des signes de toxicité; cet examen s'attache particulièrement à l'intégrité et au fonctionnement des appareils reproducteurs mâles et femelles ainsi qu'à la santé, la croissance, le développement et la fonction reproductrice de la descendance. Au moment du sevrage, les descendants sélectionnés sont affectés à divers sous-groupes (cohortes 1 à 3, voir paragraphes 33 et 34 et figure 1) afin de faire l'objet d'évaluations supplémentaires, portant notamment sur la maturation sexuelle, l'intégrité et le fonctionnement des organes reproducteurs, les effets neurologiques et comportementaux, et les fonctions immunitaires.

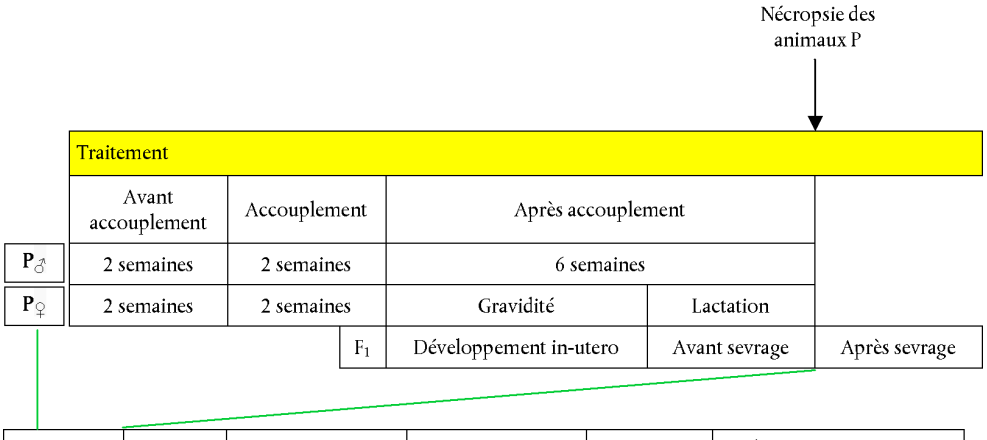
8. Lors de la réalisation de l'étude, il est recommandé de suivre les principes et considérations énoncés dans le document d'orientation n° 19 de l'OCDE sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques en tant qu'effets mesurés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité (34).

▼M5

9. Quand un nombre suffisant d'études aura été conduit afin d'analyser l'impact de cette nouvelle méthode d'essai, celle-ci sera examinée et, si nécessaire, révisée à la lumière de l'expérience acquise.

Figure 1

Protocole de l'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération



Génération parentale	Cohorte	Désignation	Animaux/cohorte	Maturation sexuelle	Âge approximatif à la nécropsie
Objectif de 20 portées par groupe	1A	Reprotoxicité	20 M + 20 F	Oui	13
	1B	Reprotoxicité	20 M + 20 F	Oui	14 ou 20-25 le cas échéant
	2A	Neurotoxicité	10 M + 10 F @	Oui	11-12
	2B	Neurotoxicité	10 M + 10 F @	Non	3
	3	Immunotoxicité	10 M + 10 F @	Oui	8
	Surplus	Sujets de rechange		Non	3

@ un par portée, représentatif si possible, de 20 portées au total

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE/PRÉPARATIONS POUR L'ESSAI

Animaux

Choix des espèces et des souches

10. L'espèce utilisée pour l'étude de toxicité pour la reproduction est choisie avec soin en fonction de l'ensemble des données disponibles. Cependant, en raison de l'abondance des données existantes et de la comparabilité par rapport aux essais de toxicité générale, le choix se porte généralement sur le rat et les critères et recommandations présentés dans la présente méthode d'essai se rapportent à cette espèce. Si l'on utilise une autre espèce, il faut le justifier et adapter le protocole en conséquence. Les souches présentant un faible taux de fécondité ou une fréquence élevée d'anomalies du développement sont à éviter.

Âge, poids corporel et critères d'inclusion

11. On utilisera des animaux parents sains, n'ayant pas été soumis à des expériences antérieures. L'étude porte à la fois sur les mâles et les femelles, lesquelles sont nullipares et non gravides. Les animaux P sont sexuellement matures, de poids similaire (à sexe identique) au début du traitement, d'âge similaire (environ 90 jours) au moment de l'accouplement, et représentatifs de l'espèce et de la souche étudiés. Ils sont acclimatés pendant au moins 5 jours après leur arrivée au laboratoire. Les animaux sont répartis au hasard entre groupes de traitement et groupes témoins, de manière que les poids moyens de chaque groupe soient comparables (c'est-à-dire à ± 20 % de la moyenne globale).

▼**M5**

Conditions d'encagement et d'alimentation

12. L'animalerie est à 22 °C (± 3 °C), avec une humidité relative située entre 30 et 70 %, l'idéal étant qu'elle soit maintenue entre 50 et 60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Un régime alimentaire classique pour animaux de laboratoire, avec eau potable à satiété, conviendra. On contrôlera attentivement la teneur en phytœstrogènes de l'alimentation, qui est susceptible, si elle est élevée, de modifier certains effets sur la reproduction. Les régimes alimentaires standard à formulation libre, dans lesquels la teneur en substances œstrogéniques a été réduite, sont recommandés (2) (30). Le choix des aliments sera guidé par la nécessité d'assurer un mélange convenable de la substance d'essai, lorsque celle-ci est administrée dans les aliments. Il convient de vérifier la concentration, l'homogénéité et la stabilité de la substance d'essai dans l'alimentation. La nourriture et l'eau de boisson seront analysées régulièrement pour rechercher des contaminants. Des échantillons de chaque lot de nourriture utilisé au cours de l'étude sont conservés dans des conditions appropriées (par exemple congelés à – 20 °C), jusqu'à la finalisation du rapport, dans l'éventualité où les résultats exigeraient une analyse supplémentaire des ingrédients consommés.

13. Les animaux sont encagés par petits groupes d'individus de même sexe recevant la même dose. On envisagera un encagement individuel pour éviter d'éventuelles blessures (par exemple entre mâles après la période d'accouplement). Il convient que l'accouplement se déroule dans des cages propices à cette fin. Dès constatation de la copulation, les femelles présumées gravides sont hébergées séparément dans des cages destinées à la mise bas ou à la maternité, où leur sont fournis des matériaux de nidification appropriés et déterminés. Les portées sont hébergées avec leur mère jusqu'au sevrage. Les animaux F1 sont encagés par petits groupes d'individus de même sexe et recevant la même dose, du sevrage au sacrifice. On peut encager les animaux individuellement si une nécessité scientifique le justifie. Le type de litière choisi contient le moins possible de phytœstrogènes.

Nombre et identification des animaux

14. Normalement, chaque groupe d'essai ou groupe témoin contient un nombre de couples suffisant pour produire au moins 20 femelles gravides par groupe de dose. On cherche à obtenir suffisamment de gestations pour assurer une évaluation significative de l'action de la substance étudiée sur la fertilité, la gravidité et le comportement maternel de la génération P, ainsi que sur la croissance et le développement de la descendance F1, depuis la conception jusqu'à la maturité. Si le nombre de femelles gravides souhaité n'est pas atteint, l'étude n'est pas nécessairement invalidée et chaque échec sera analysé au cas par cas pour rechercher d'éventuels liens de cause à effet avec la substance d'essai.

15. Chaque animal P se voit attribuer un numéro d'identification unique avant le début du traitement. Si les données historiques du laboratoire suggèrent qu'une part importante des femelles est susceptible de ne pas présenter des cycles œstraux réguliers (de 4 ou 5 jours), il est conseillé d'étudier les cycles œstraux avant d'administrer les doses. Une autre option consiste à agrandir les groupes de façon à garantir qu'au moins 20 femelles dans chaque groupe présentent des cycles œstraux réguliers (4 ou 5 jours) au moment de commencer le traitement. Tous les descendants F1 sont identifiés de manière unique lors du premier examen des nouveau-nés effectué le jour de leur naissance (jour postnatal: JPN 0) ou un jour après (JPN 1). Tout au long de l'étude, on gardera la trace de la portée d'origine de tous les animaux de la génération F1, puis de la génération F2 si elle est produite.

▼M5

Substance d'essai

Informations disponibles sur la substance d'essai

16. Il importe d'examiner les données existantes pour choisir la voie d'administration, le véhicule et l'espèce utilisée, sélectionner les doses et éventuellement adapter le programme de traitement. Ainsi, il convient que la planification d'une étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération tienne compte de toutes les informations pertinentes disponibles concernant la substance d'essai, à savoir propriétés physico-chimiques, toxicocinétiques (y compris métabolisme propre à l'espèce) et toxicodynamiques, relations structure-activité (RSA), mécanismes métaboliques in vitro, résultats des études de toxicité antérieures et données utiles sur les analogues de structure. Certaines informations préliminaires sur l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination (ADME), ainsi que sur la bioaccumulation, peuvent être déduites de la structure chimique, des données physico-chimiques, de la capacité de liaison aux protéines plasmatiques ou des études toxicocinétiques; les résultats des études de toxicité livrent des informations supplémentaires, notamment sur la CSENO, le métabolisme ou l'induction du métabolisme.

Prise en compte des données toxicocinétiques

17. Même si elles ne sont pas obligatoires, les données toxicocinétiques tirées d'études antérieures préliminaires de détermination des concentrations ou autres études sont extrêmement utiles pour planifier l'étude, sélectionner les niveaux de dose et interpréter les résultats. Sont particulièrement utiles les données qui: 1) vérifient l'exposition à la substance d'essai (ou à ses métabolites importants) des fœtus et des petits en cours de développement, 2) livrent une estimation de la dosimétrie interne et 3) évaluent la saturation potentielle des mécanismes cinétiques en fonction de la dose. Il convient aussi de prendre en compte, lorsqu'elles sont disponibles, d'autres informations toxicocinétiques comme le profil des métabolites, la fonction concentration-temps, etc. On pourra aussi recueillir pendant l'étude principale des données toxicocinétiques supplémentaires, à condition que cela n'interfère pas avec la détermination et l'interprétation des principaux effets étudiés.

En règle générale, les données toxicocinétiques suivantes seront utiles pour planifier l'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération:

— en fin de gestation (par exemple au 20e jour de gestation) — sang de la mère et du fœtus,

— au milieu de l'allaitement (JPN 10) — sang maternel, sang du petit et/ou lait,

— peu après le sevrage (par exemple JPN 28) — échantillons sanguins des petits sevrés.

La souplesse sera de mise dans la détermination des substances spécifiques à analyser (par exemple la substance parente et/ou ses métabolites) et du programme d'échantillonnage. Par exemple, le nombre et le moment des prélèvements d'échantillons le jour prévu dépendront des voies d'exposition et des connaissances existantes concernant les propriétés toxicocinétiques chez les animaux non gravides. Quand la substance d'essai est administrée dans la nourriture, il suffit de prélever les échantillons à heure fixe les jours concernés, tandis que pour l'administration par gavage, des prélèvements supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires dans la même journée pour obtenir une meilleure estimation de la gamme des doses internes. Il n'est toutefois pas nécessaire de tracer l'intégralité de la fonction concentration-temps, pour quelque jour de prélèvement que ce soit. Si nécessaire, les prélèvements sanguins destinés aux analyses des fœtus et des nouveau-nés peuvent être regroupés par sexe pour une même portée.

▼M5

Voie d'administration

18. Il convient que le choix de la voie d'administration tienne compte de la voie ou des voies les plus appropriées à l'exposition humaine. Bien que le protocole prévoie l'administration de la substance d'essai dans la nourriture, il peut être modifié au profit d'une autre voie (eau de boisson, gavage, inhalation, voie cutanée), en fonction des caractéristiques de la substance chimique et des informations recherchées.

Choix du véhicule

19. S'il y a lieu, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. On recommande, si possible, de recourir en priorité à une solution ou suspension aqueuse, ou à défaut à une solution ou suspension huileuse (par exemple dans l'huile de maïs). Si le véhicule n'est pas aqueux, il convient que sa toxicité soit connue. Les véhicules susceptibles de présenter une toxicité intrinsèque sont à proscrire (par exemple acétone, DMSO). Il faut déterminer la stabilité de la substance d'essai dans le véhicule. Il convient en outre de tenir compte des caractéristiques suivantes lorsqu'un véhicule ou un autre adjuvant est utilisé pour faciliter l'administration: effets sur l'absorption, la répartition, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité; effets sur la consommation de nourriture ou d'eau et sur l'état nutritionnel des animaux.

Choix des doses

20. Normalement, l'étude porte sur au moins trois niveaux de dose et un témoin concomitant. Pour sélectionner les niveaux de dose appropriés, l'expérimentateur tient compte de toutes les informations disponibles, y compris les données relatives au dosage des études antérieures, les résultats toxicocinétiques concernant les animaux gravides ou non gravides, l'importance du transfert dans le lait, et les estimations de l'exposition humaine. Si les données toxicocinétiques disponibles indiquent une saturation des mécanismes toxicocinétiques en fonction de la dose, on s'efforcera d'éviter les doses élevées induisant clairement une saturation, à condition, bien entendu, que les expositions humaines attendues soient bien inférieures à ce seuil de saturation. Le niveau de la dose maximale devra alors correspondre au point d'inflexion vers un comportement toxicocinétique non linéaire, ou lui être légèrement supérieur.

21. À défaut de données toxicocinétiques pertinentes, les niveaux de dose sont définis en fonction des effets toxiques, dans la limite des propriétés physiques/chimiques de la substance d'essai. Si les niveaux de dose sont fixés d'après la toxicité, la dose maximale est celle qui induit une certaine toxicité systémique, sans provoquer de décès ni de souffrances aiguës des animaux.

22. On sélectionnera une séquence de doses décroissantes afin de mettre en évidence une éventuelle relation dose-effet et de déterminer les CSENO ou les doses proches de la limite de détection, ce qui permettra de déduire une dose de référence pour le(s) paramètre(s) d'évaluation le(s) plus sensible(s). Pour éviter des écarts de dose importants entre CSENO et CMENO, le recours à des multiples de deux ou quatre est généralement optimal. L'adjonction d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à l'application d'intervalles très espacés (par exemple supérieur à un facteur 10) entre les doses.

23. Les animaux du groupe témoin sont manipulés de la même manière que les animaux traités, à l'exception du fait qu'ils ne reçoivent pas la substance d'essai. Ce groupe témoin ne sera pas traité ou recevra un placebo, ou le véhicule si l'administration de la substance d'essai en nécessite un. Si un véhicule est employé, les animaux du groupe témoin devront recevoir le plus grand volume utilisé de ce véhicule.

▼M5

Essai limite

24. Si des essais à doses répétées conduits à une dose d'au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour ne produisent aucun effet toxique observable, ou s'il n'y a pas de raison de penser que la substance est toxique compte tenu des données dont on dispose au sujet de composés présentant une structure et/ou une action métabolique similaires et des propriétés métaboliques in vivo/in vitro similaires, il n'est pas indispensable de mener une étude complète sur plusieurs doses différentes. Dans cette éventualité, l'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération se limitera à un groupe témoin et à une dose unique d'au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour. Cependant, si cette dose limite provoque des signes de toxicité pour la reproduction ou le développement, d'autres études conduites à des doses inférieures s'imposent pour définir une CSENO. Ces remarques concernant l'essai limite ne sont valables que si le niveau de l'exposition humaine n'implique pas d'évaluer des doses supérieures.

PROTOCOLES

Exposition de la descendance

25. On privilégiera l'administration dans la nourriture comme voie d'exposition. Dans le cas des études par gavage, il faut noter que, normalement, les petits ne recevront la substance d'essai qu'indirectement par le lait maternel jusqu'à ce qu'on leur administre la dose directement, à partir du sevrage. Lorsque la substance d'essai est mélangée à la nourriture ou à l'eau de boisson, les petits recevront aussi la substance d'essai directement, dès qu'ils commenceront à s'alimenter tout seuls pendant la dernière semaine d'allaitement. La méthodologie est modifiée lorsque l'excrétion de la substance d'essai dans le lait est faible ou que l'exposition continue de la descendance n'est pas avérée. Dans ces cas, on envisagera de traiter directement les petits pendant l'allaitement en fonction des données toxicocinétiques disponibles, de la toxicité pour la descendance ou de l'évolution des biomarqueurs (3), (4). Il convient d'évaluer soigneusement les avantages et les inconvénients avant la mise en œuvre d'études d'administration directe aux petits allaités (5).

Programme de traitement et administration des doses

26. Il se peut qu'on dispose d'informations sur les cycles œstraux, de données histopathologiques sur les tractus reproducteurs mâles et femelles et d'analyses des spermatozoïdes testiculaires/épididymaires provenant d'études de toxicité à doses répétées antérieures d'une durée adéquate. Pour ce qui est de l'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération, la durée du traitement avant l'accouplement doit donc permettre de détecter les effets des modifications fonctionnelles susceptibles de perturber le comportement d'accouplement et la fertilisation. Il convient que le traitement avant l'accouplement dure suffisamment longtemps pour atteindre des conditions d'exposition stables chez les mâles et les femelles P. Généralement, une période de 2 semaines conviendra pour les deux sexes. Chez les femelles, cette période correspond à 3 à 4 cycles œstraux complets et devrait suffire à identifier d'éventuels effets nocifs sur la cyclicité. Chez les mâles, elle correspond à la durée nécessaire à la migration des spermatozoïdes en maturation dans l'épididyme, et devrait permettre de détecter les effets posttesticulaires sur le sperme (au cours des derniers stades de la spermiation et de la maturation des spermatozoïdes épididymaires) au moment de l'accouplement. Au moment du sacrifice, quand l'examen histopathologique des testicules et épididymes et l'analyse des caractéristiques du sperme sont programmés, les mâles P et F1 auront donc été exposés à la substance d'essai pendant au moins un cycle entier de spermatogenèse [(6) (7) (8) (9) et document d'orientation n° 151 de l'OCDE (40)].

▼**M5**

27. Les scénarios d'exposition des mâles avant l'accouplement peuvent être adaptés si des études antérieures ont clairement mis en évidence une toxicité testiculaire (anomalie de la spermatogenèse) ou des effets sur l'intégrité et le fonctionnement des spermatozoïdes. De la même manière, pour les femelles, l'existence d'effets avérés de la substance d'essai sur les cycles œstraux et, par conséquent, sur la réceptivité sexuelle peut motiver une modification des scénarios d'exposition avant l'accouplement. Dans certains cas particuliers, on pourra attendre de détecter des spermatozoïdes par frottis vaginal avant de commencer le traitement des femelles P [voir document d'orientation n° 151 de l'OCDE (40)].

28. Une fois que la durée de la période d'exposition avant l'accouplement est définie, les animaux sont traités en continu avec la substance d'essai, 7 jours sur 7 jusqu'à la nécropsie. Le mode d'administration sera le même pour tous les animaux. Le traitement se poursuivra pendant les deux semaines de la période d'accouplement et, pour les femelles P, au cours de la gestation puis de l'allaitement jusqu'à leur sacrifice après le sevrage. Les mâles seront traités de la même façon jusqu'à leur sacrifice, au moment du sevrage des animaux F1. En ce qui concerne la nécropsie, la priorité est donnée aux femelles qui seront nécropsiées le même jour ou un jour similaire de lactation. La nécropsie des mâles peut s'étaler sur un plus grand nombre de jours, selon les équipements du laboratoire. À moins d'avoir débuté pendant la période de lactation, l'administration de la substance d'essai directement aux mâles et femelles F1 sélectionnés commence au moment du sevrage et se poursuit jusqu'à la date programmée pour la nécropsie, en fonction de la cohorte.

29. Il importe de s'assurer que les quantités de substance administrées dans la nourriture ou l'eau de boisson n'interfèrent pas avec la nutrition ou l'équilibre hydrique. Lorsque la substance d'essai est ajoutée à la nourriture, deux possibilités sont offertes: soit le maintien d'une concentration constante dans les aliments (ppm), soit le maintien d'un niveau de dose constant par rapport au poids corporel des animaux; il y a lieu de préciser l'option retenue.

30. Si la substance d'essai est administrée par gavage, le volume maximal de liquide administré en une seule fois ne dépasse pas 1 ml/l00 g de poids corporel (0,4 ml/100 g de poids pour l'huile, de maïs par exemple). S'il ne s'agit pas de substances irritantes ou corrosives dont les effets doivent en principe s'intensifier aux concentrations supérieures, on réduira au minimum la variabilité du volume d'essai en adaptant les concentrations de façon à obtenir un volume constant à toutes les doses. Le produit est administré chaque jour à heure fixe. La dose reçue par chaque animal est normalement calculée sur la base de la pesée la plus récente de l'animal, et est ajustée au moins une fois par semaine pour les mâles adultes et les femelles adultes non gravides, et tous les deux jours pour les femelles gravides et les descendants F1 si elle est administrée avant le sevrage et pendant les deux semaines qui suivent le sevrage. Si les données toxicocinétiques indiquent un faible transfert de la substance d'essai dans le placenta, il faudra éventuellement revoir la dose administrée par gavage pendant la dernière semaine de gestation afin d'éviter de traiter la mère avec une dose excessivement toxique. Le jour de la mise bas, les femelles ne sont pas traitées par gavage ou toute autre voie d'administration impliquant la manipulation de l'animal; il est en effet préférable de ne pas les traiter ce jour-là plutôt que de perturber le processus de la naissance.

▼M5

Accouplement

31. Chaque femelle P est placée avec un seul mâle non apparenté choisi au hasard dans le même groupe de dose (accouplement 1:1) jusqu'à ce que la copulation soit avérée ou pendant deux semaines. Si le nombre de mâles est insuffisant, en raison par exemple de décès de mâles avant la mise en couple, on pourra placer un ou plusieurs des mâles s'étant déjà accouplé(s) avec une seconde femelle (1:1), afin que toutes les femelles aient un partenaire. Le jour 0 de la gestation est celui où l'accouplement est avéré (observation de sperme ou d'un bouchon vaginal). Les animaux sont séparés dès que possible une fois que la copulation a été confirmée. Si les animaux ne se sont toujours pas accouplés au bout de deux semaines, ils sont séparés sans autre tentative d'accouplement. Les couples sont clairement identifiés dans les résultats.

Taille des portées

32. Au quatrième jour après la naissance, on peut ajuster la taille de chaque portée en éliminant des petits surnuméraires choisis au hasard, afin de s'approcher autant que possible du nombre de cinq mâles et cinq femelles par portée. Il ne convient pas de procéder à une élimination sélective des petits, par exemple basée sur le poids corporel. Lorsque le nombre de petits mâles et femelles est tel qu'il empêche de disposer de cinq animaux de chaque sexe par portée, il est acceptable de procéder à des ajustements partiels (par exemple six mâles et quatre femelles).

Sélection des petits pour les études après le sevrage (voir figure 1)

33. Au moment du sevrage (vers le JPN 21), on sélectionne des petits de toutes les portées disponibles, avec un maximum de 20 portées par groupe de dose et témoin, afin de les soumettre à des examens ultérieurs et de les élever jusqu'à la maturation sexuelle (sauf si des essais sont nécessaires avant). La sélection des petits est aléatoire, si ce n'est qu'il convient d'écarter les individus clairement chétifs (dont le poids corporel est inférieur de plus de deux écarts-types au poids moyen des petits de la même portée), dans la mesure où ils ne sont sans doute pas représentatifs du groupe de traitement.

Au JPN 21, les petits F1 sélectionnés sont affectés au hasard à l'une des trois cohortes d'animaux suivantes:

cohorte 1 (1A et 1B) = essai de toxicité pour la reproduction/le développement,

cohorte 2 (2A et 2B) = essai de neurotoxicité pour le développement,

cohorte 3 = essai d'immunotoxicité pour le développement.

Cohorte 1A: un mâle et une femelle/portée/groupe (20/sexe/groupe): sélection prioritaire pour l'évaluation primaire des effets sur l'appareil reproducteur et de la toxicité générale.

Cohorte 1B: un mâle et une femelle/portée/groupe (20/sexe/groupe): sélection prioritaire pour l'évaluation ultérieure de la capacité de reproduction lors de l'accouplement d'animaux F1 [voir document d'orientation n° 117 de l'OCDE (39)] et pour obtenir des informations histopathologiques supplémentaires dans le cas d'agents présumés toxiques pour la reproduction ou le système endocrinien, ou quand les résultats de la cohorte 1A sont équivoques.

Cohorte 2A: total de 20 petits par groupe (10 mâles et 10 femelles par groupe; 1 mâle ou 1 femelle par portée) destinés à des tests neurocomportementaux suivis d'un examen neurohistopathologique à l'âge adulte.

Cohorte 2B: total de 20 petits par groupe (10 mâles et 10 femelles par groupe; 1 mâle ou 1 femelle par portée) destinés à un examen neurohistopathologique au moment du sevrage (JPN 21 ou JPN 22). Si les animaux ne sont pas assez nombreux, ils seront affectés en priorité à la cohorte 2A.

▼M5

Cohorte 3: total de 20 petits par groupe (10 mâles et 10 femelles par groupe, dont 1 individu par portée, si possible). Il pourra y avoir lieu d'utiliser des petits supplémentaires issus du groupe témoin, qui serviront de témoins positifs pour l'essai de réponse anticorps dépendante des lymphocytes T, au JPN 56 ± 3.

34. Si l'une des portées ne compte pas suffisamment de petits pour toutes les cohortes, ils sont affectés en priorité à la cohorte 1, qui peut ensuite servir à produire une génération F2. Il est possible d'affecter davantage de petits à l'une des cohortes en cas de préoccupations spécifiques, par exemple quand une substance chimique est présumée neurotoxique, immunotoxique ou reprotoxique. Ces petits pourront servir à des examens menés à des moments différents ou pour l'évaluation d'effets supplémentaires. Les petits non affectés aux cohortes feront l'objet d'un examen biochimique clinique (paragraphe 55) et d'une nécropsie macroscopique (paragraphe 68).

Second accouplement des animaux P

35. On déconseille généralement de procéder à un second accouplement des animaux P, ce qui entraînerait la perte d'informations importantes sur le nombre de points d'implantation (et donc de données postimplantation et périnatales, indicatrices d'une éventuelle action tératogène) concernant la première portée. S'il y a lieu de vérifier ou d'élucider un effet chez les femelles exposées, il est préférable d'étendre l'étude à un accouplement de la génération F1. Cependant, il est toujours possible de procéder à un second accouplement des mâles P avec des femelles non traitées afin de clarifier les résultats équivoques ou pour mieux caractériser les effets sur la fertilité observés à la suite du premier accouplement.

OBSERVATIONS IN VIVO

Observations cliniques

36. Les animaux P et F1 sélectionnés font l'objet d'une observation clinique générale quotidienne. Si l'administration se fait par gavage, ces observations cliniques auront lieu avant et après le traitement (pour rechercher d'éventuels signes de toxicité associés aux pics de concentration plasmatique). On note les changements de comportement pertinents, les signes de mise bas prolongée ou difficile et tous les signes de toxicité. Deux fois par jour, ou une fois par jour pendant le week-end, on surveille les manifestations de toxicité sévère, la morbidité et la mortalité sur l'ensemble des animaux.

37. En outre, tous les individus P et F1 (après le sevrage) font l'objet une fois par semaine d'un examen plus détaillé, qu'il sera commode d'effectuer à l'occasion d'une pesée de l'animal, ce qui limitera le stress lié à la manipulation. Les observations sont effectuées avec soin et consignées conformément aux systèmes de cotation définis par le laboratoire d'essai. On s'attache particulièrement à réduire au minimum les variations affectant les conditions de l'essai. Les observations notées portent, sans que cette liste soit exhaustive, sur les modifications de la peau, de la fourrure, des yeux et des muqueuses, sur l'apparition de sécrétions et d'excrétions et sur les activités réflexes (par exemple larmes, érection des poils, diamètre de la pupille, rythme respiratoire inhabituel). Il convient également de noter tout changement dans la démarche ou la posture, les réactions à la manipulation ainsi que l'apparition de mouvements spasmodiques ou de contractures, de stéréotypes (par exemple toilettage excessif, circuits répétitifs) ou de comportements bizarres (par exemple automutilation, marche à reculons).

▼M5

Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau

38. Les animaux P sont pesés le jour de la première administration et ensuite au moins une fois par semaine. En outre, les femelles P sont pesées pendant l'allaitement, les mêmes jours que la pesée des petits de leurs portées (voir paragraphe 44). Tous les animaux F1 sont pesés individuellement au moment du sevrage (JPN 21) et au moins chaque semaine par la suite. On relève aussi le poids corporel des animaux le jour où ils atteignent la puberté (séparation préputiale ou ouverture vaginale observables). Tous les animaux sont pesés au moment du sacrifice.

39. Au cours de l'étude, la consommation de nourriture et d'eau (si la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson) est consignée au moins une fois par semaine, le même jour que la pesée des animaux (sauf pendant la cohabitation). La consommation de nourriture de chaque cage d'animaux F1 est notée une fois par semaine, dès l'affectation à une cohorte particulière.

Cycles œstraux

40. Les éventuelles informations préliminaires concernant les effets de la substance d'essai sur le cycle œstral, fournies par de précédentes études de toxicité à doses répétées, pourront être mises à profit pour élaborer un protocole d'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération propre à la substance chimique concernée. Normalement, l'évaluation de la cyclicité œstrale (par cytologie vaginale) commence au début de la période de traitement et se poursuit jusqu'à ce que l'accouplement soit avéré ou jusqu'à la fin de la période d'accouplement de deux semaines. Si l'on a vérifié la normalité des cycles œstraux des femelles avant d'administrer la substance d'essai, il est utile de poursuivre les frottis quand le traitement démarre, mais si l'on craint des effets non spécifiques au démarrage du traitement (par exemple une baisse marquée de la consommation de nourriture), on pourra laisser les animaux s'adapter au traitement pendant 2 semaines au maximum avant la période d'observation des frottis (de 2 semaines) qui précède la période d'accouplement. Si l'on prolonge ainsi la période de traitement des femelles (ce qui porte à 4 semaines le traitement avant accouplement), on pourra envisager d'acheter les animaux plus jeunes et de rallonger aussi la période de traitement des mâles avant la mise en couple. Pour obtenir des cellules vaginales ou cervicales, on prendra soin d'éviter d'agresser la muqueuse ce qui risquerait d'induire une pseudo-gestation (10) (11).

41. Les frottis vaginaux sont examinés chaque jour pour l'ensemble des femelles F1 de la cohorte 1A, à partir de l'ouverture du vagin jusqu'à l'observation des premières cellules kératinisées, afin de déterminer l'intervalle de temps entre ces deux événements. Il convient également de suivre les cycles œstraux de toutes les femelles F1 de la cohorte 1A pendant 2 semaines, à partir du 75e jour postnatal environ. En outre, si l'accouplement de la génération F1 s'impose, la cytologie vaginale des femelles de la cohorte 1B se poursuivra depuis la mise en couple jusqu'à ce que la copulation ait eu lieu.

Accouplement et gravidité

42. Outre les paramètres standard (par exemple poids corporel; consommation de nourriture; observations cliniques, dont contrôle de la mortalité/morbidité), on relève les dates de mise en couple, d'insémination et de mise bas, et on calcule l'intervalle précoïtal (entre la mise en couple et l'insémination) et la durée de la gestation (entre l'insémination et la mise bas). Il convient d'examiner minutieusement les femelles P au moment prévu pour la mise bas afin de repérer d'éventuels symptômes de dystocie. Toute anomalie du comportement de nidification ou d'allaitement devra être relevée.

▼M5

43. Le jour de la parturition correspond au jour 0 de l'allaitement pour la mère, et au jour postnatal 0 (JPN 0) pour la descendance. Il est aussi possible de compter les jours à partir de la copulation pour éviter les erreurs sur les données relatives au développement postnatal dues aux différences de durée de gestation; il convient toutefois de noter également les jours à partir de la mise bas. Ce changement de référence est particulièrement important lorsque la substance d'essai influence la durée de la gestation.

Caractéristiques de la descendance

44. On examine chaque portée dès que possible après la mise bas (JPN 0 ou 1) afin d'établir le nombre et le sexe des petits, la mortinatalité, le nombre de naissances vivantes et la présence d'anomalies macroscopiques [anomalies externes visibles (y compris fentes palatines, hémorragies sous-cutanées, anomalies de la couleur ou de la texture de la peau, présence du cordon ombilical, absence de lait dans l'estomac, présence de sécrétions séchées)]. De plus, le premier examen clinique des nouveau-nés est l'occasion d'effectuer une évaluation qualitative de la température corporelle, du degré d'activité et de la réaction à la manipulation. Chez les petits morts à JPN 0 ou plus tard, on recherche d'éventuelles anomalies et la cause du décès. Les petits en vie sont comptés et pesés individuellement à JPN 0 ou JPN 1, puis régulièrement, par exemple au moins aux JPN 4, 7, 14 et 21. Les examens cliniques, qui dépendent de l'âge des animaux, sont répétés à chaque pesée des descendants, voire plus souvent si des cas spécifiques ont été révélés au moment de la naissance. Les symptômes à surveiller sont notamment les suivants (liste non exhaustive): anomalies externes, modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux, des muqueuses, apparition de sécrétions et d'excrétions et de réactions neurovégétatives. Il convient également de noter tout changement dans la démarche ou la posture, les réactions à la manipulation ainsi que l'apparition de mouvements spasmodiques ou de contractures, de stéréotypies ou de comportements bizarres.

45. On mesure la distance anogénitale (DAG) de chaque petit au moins une fois entre les JPN 0 et 4. Le poids corporel des petits est relevé le jour de la mesure de la DAG, qui est rapportée à la taille du petit, de préférence la racine cubique du poids corporel (12). On recherche la présence de tétons/aréoles chez les petits mâles aux JPN 12 ou 13.

46. On commence à surveiller quotidiennement les signes de séparation balano-préputiale ou d'ouverture vaginale sur tous les animaux F1 avant le jour prévu d'apparition de ces signes, afin de détecter une éventuelle maturation sexuelle précoce. Toute anomalie persistante des organes génitaux, telle que filaments vaginaux, hypospadias ou pénis bifide est notée. La maturité sexuelle des animaux F1 est comparée au développement physique en déterminant l'âge et le poids corporel au moment de la séparation balano-préputiale chez le mâle ou de l'ouverture vaginale chez la femelle (13).

Évaluation du potentiel de neurotoxicité pour le développement (cohortes 2A et 2B)

47. L'évaluation de la neurotoxicité s'appuie sur les individus des cohortes 2A et 2B, qui comptent chacune 10 mâles et 10 femelles issus de chaque groupe de traitement (1 mâle ou 1 femelle par portée; chaque portée représentée par au moins 1 petit; sélection au hasard). Les animaux de la cohorte 2A seront soumis à une batterie d'observations fonctionnelles, à une évaluation du réflexe de sursaut auditif, de l'activité motrice (voir paragraphes 48-50) et

▼M5

à une évaluation neuropathologique (voir paragraphes 74 et 75). On s'attachera particulièrement à réduire au minimum les variations affectant l'ensemble des conditions de l'essai et à s'assurer qu'elles ne sont pas systématiquement liées au traitement. Parmi les variables susceptibles de jouer sur le comportement figurent le niveau sonore (par exemple bruits intermittents), la température, l'humidité, l'éclairage, les odeurs, l'heure du jour et les distractions liées à l'environnement extérieur. Il convient d'interpréter les résultats des essais de neurotoxicité en fonction des ordres de grandeur de référence appropriés provenant des groupes témoins historiques. L'évaluation neuropathologique des animaux de la cohorte 2B aura lieu aux JPN 21 ou 22 (voir paragraphes 74 et 75).

48. On testera le réflexe de sursaut auditif des animaux de la cohorte 2A au JPN 24 (± 1 jour). L'évaluation des groupes traités et témoins est répartie de manière équilibrée au cours de la journée. Chaque session comporte 50 essais. Pour ces tests de sursaut auditif, on calculera l'amplitude de la réponse moyenne pour chaque bloc de 10 essais (5 blocs de 10 essais), dont les conditions sont optimisées pour permettre une accoutumance intrasession. Ces protocoles sont conformes à la méthode d'essai B.53 (35).

49. À un moment approprié entre les JPN 63 et 75, les animaux de la cohorte 2A sont soumis à la batterie d'observations fonctionnelles ainsi qu'à un test automatisé de motricité. Ces procédures sont conformes aux méthodes d'essai B.43 (33) et B.53 (35). La batterie d'observations fonctionnelles comprend une description complète de l'apparence, du comportement et de l'intégrité fonctionnelle du sujet. Ces évaluations sont basées sur des observations effectuées dans la cage d'hébergement puis dans un espace d'observation normalisé (plan ouvert) où l'animal peut se déplacer librement, et sur des tests de manipulation. On procédera aux essais par ordre d'interactivité croissante. Une liste de mesures est présentée à l'appendice 1. Tous les animaux sont examinés soigneusement par des observateurs formés à cet effet et ignorant le traitement reçu par l'animal, suivant des protocoles normalisés destinés à limiter la variabilité liée à l'observateur. Dans la mesure du possible, il est recommandé de confier au même observateur l'évaluation de tous les animaux d'un test donné. À défaut, il convient de démontrer la fiabilité interobservateurs. Pour chaque paramètre de la batterie de tests comportementaux, il faudra se référer à des échelles et des critères de cotation dont les modes opératoires sont définis explicitement. Si possible, des mesures quantitatives objectives sont effectuées pour les observations impliquant une cotation subjective. Concernant l'activité motrice, chaque animal est testé individuellement. La séance d'essai dure assez longtemps pour permettre de démontrer l'accoutumance intrasession des témoins. L'activité motrice est contrôlée à l'aide d'un appareil d'enregistrement automatique capable de détecter aussi bien des augmentations que des diminutions d'activité (c'est-à-dire que l'activité de base mesurée par le dispositif ne doit pas être trop faible, ce qui empêcherait la détection des diminutions d'activité, ni trop forte, ce qui empêcherait la détection d'augmentations). Tous les appareils sont testés selon des protocoles standard afin de garantir, dans la mesure du possible, la reproductibilité entre appareils et entre dates de mesure. Il convient d'équilibrer au mieux les groupes de traitement affectés à chaque appareil. Les groupes d'évaluation de l'essai sont répartis sur la journée pour tenir compte des rythmes d'activité circadiens.

50. S'il existe des informations indiquant que d'autres essais fonctionnels s'imposent (par exemple sensoriels, sociaux, cognitifs), ces essais seront inclus dans le protocole de l'étude sans compromettre l'intégrité des autres évaluations prévues. Si ces autres essais portent sur les mêmes animaux que ceux soumis au test du sursaut auditif, à la batterie d'observations fonctionnelles et au test de motricité, il convient de les programmer à des moments différents pour limiter le risque de perturbation. Des protocoles supplémentaires peuvent se révéler particulièrement utiles lorsque l'observation empirique, les effets anticipés ou divers aspects liés au mécanisme ou au mode d'action suggèrent un type spécifique de neurotoxicité.

▼M5

Évaluation du potentiel d'immunotoxicité pour le développement (cohorte 3)

51. Au JPN 56 (± 3 jours), 10 mâles et 10 femelles de la cohorte 3 issus de chaque groupe de traitement (1 mâle ou 1 femelle par portée; chaque portée représentée par au moins 1 petit; sélection au hasard) seront soumis à un essai de réponse anticorps dépendant des lymphocytes T, pour rechercher des anticorps IgM produits au cours de la réponse primaire à un antigène dépendant des lymphocytes T, par exemple les globules rouges de mouton (GRM) ou l'hémocyanine de patelle (KLH); ces essais seront conformes aux protocoles actuels d'étude de l'immunotoxicité (14) (15). La réponse peut être évaluée par comptage des cellules formatrices de plaques (CFP) spécifiques dans la rate ou par titrage sérique des anticorps IgM spécifiques aux GRM ou à la KLH par ELISA, au moment du pic de réponse. En général, les réponses atteignent un pic 4 jours (pour le comptage des CFP) ou 5 jours (par ELISA) après l'immunisation par voie intraveineuse. Si la réponse primaire des anticorps est évaluée par comptage des CFP, il est permis de répartir les animaux en sous-groupes évalués à des jours différents, aux conditions suivantes: l'intervalle entre l'immunisation et le sacrifice d'un sous-groupe est défini de manière que les CFP soient comptés au moment du pic de la réponse; les sous-groupes contiennent le même nombre de descendants mâles et femelles issus de tous les groupes de dose, y compris les témoins; et les sous-groupes sont examinés à peu près au même âge postnatal. On continuera d'administrer la substance d'essai jusqu'au jour qui précède le prélèvement de la rate des animaux pour l'évaluation de la réponse des CFP ou du sérum pour l'essai ELISA.

Évaluation ultérieure du potentiel de reprotoxicité (cohorte 1B)

52. On peut continuer d'administrer le traitement aux animaux de la cohorte 1B au-delà du JPN 90, et les élever pour produire une génération F2 si nécessaire. Les mâles et les femelles d'un même groupe de dose cohabitent (en évitant d'accoupler les membres d'une même fratrie) pour une durée allant jusqu'à 2 semaines, à partir du JPN 90 ou après, mais pas au-delà du JPN 120. Les protocoles sont les mêmes que pour les animaux P. Cependant, sur la base du poids de la preuve, il peut s'avérer suffisant de sacrifier les portées au JPN 4 au lieu de les évaluer jusqu'au sevrage ou au-delà.

OBSERVATIONS FINALES

Biochimie clinique/hématologie

53. On surveillera les effets systémiques chez les animaux P. Des échantillons sanguins sont prélevés à jeun sur un site défini chez dix mâles et femelles P par groupe de dose, sélectionnés au hasard au moment du sacrifice. Ces échantillons sont conservés dans des conditions appropriées et font l'objet d'un examen hématologique partiel ou complet, d'un examen biochimique clinique, d'un dosage de T4 et TSH, ou d'autres examens suggérés par la connaissance du profil d'effets de la substance d'essai [voir document d'orientation n° 151 de l'OCDE (40)]. Il convient d'évaluer les paramètres hématologiques suivants: hématocrite, concentration d'hémoglobine, numération des érythrocytes, numération totale et différentielle des leucocytes, numération des plaquettes et mesure du temps et du potentiel de coagulation du sang. Dans le plasma ou le sérum, on mesure les éléments suivants: glucose, cholestérol total, urée, créatinine, protéines totales, albumine et au moins deux enzymes indicatrices d'effets sur les cellules hépatiques (telles que l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase, la phosphatase alcaline, la gamma glutamyl transpeptidase et la sorbitol déshydrogénase). Dans certains cas, le dosage d'enzymes supplémentaires et des acides biliaires peut livrer des informations utiles. En outre, il est possible

▼M5

de conserver des prélèvements sanguins de tous les animaux en vue d'une éventuelle analyse ultérieure destinée à clarifier les effets équivoques ou générer des données d'exposition interne. S'il n'est pas prévu de procéder à un second accouplement, les échantillons sont prélevés dans le cadre du sacrifice programmé ou juste avant. Lorsque les animaux sont maintenus en vie, les prélèvements ont lieu quelques jours avant le second accouplement. Par ailleurs, à moins que des études à doses répétées antérieures indiquent que la substance d'essai n'influe pas sur ce paramètre, il convient de procéder à une analyse d'urine avant le sacrifice, en évaluant les critères suivants: apparence, volume, osmolalité ou densité, pH, protéines, glucose, sang et globules rouges, débris cellulaires. Des prélèvements d'urine peuvent également être effectués afin de suivre l'excrétion de la substance d'essai et/ou de son ou ses métabolites.

54. On surveillera aussi les effets systémiques chez les animaux F1. Des échantillons sanguins sont prélevés à jeun sur un site défini chez 10 mâles et femelles de la cohorte 1A par groupe de dose, sélectionnés au hasard au moment du sacrifice. Ces échantillons sont conservés dans des conditions appropriées et font l'objet d'un examen biochimique clinique standard, et notamment d'une mesure de la concentration sérique des hormones thyroïdiennes (T4 et TSH), d'un examen hématologique (numération totale et différentielle des leucocytes plus érythrocytes) et d'une analyse d'urine.

55. Les petits surnuméraires au JPN 4 font l'objet d'une nécropsie macroscopique et on peut mesurer la concentration sérique de l'hormone thyroïdienne T4 à cette occasion. Si nécessaire, les échantillons sanguins des nouveau-nés (JPN 4) peuvent être regroupés par portée aux fins d'analyses biochimiques et du dosage d'hormones thyroïdiennes. Des échantillons sanguins sont également prélevés sur les sujets tout justes sevrés soumis à une nécropsie macroscopique au JPN 22 (petits F1 non sélectionnés pour les cohortes), afin de doser la T4 et la TSH.

Caractéristiques du sperme

56. On détermine les caractéristiques du sperme pour tous les mâles de la génération P, sauf s'il existe des données montrant que ces caractéristiques ne sont pas modifiées au cours d'une étude sur 90 jours. Les caractéristiques du sperme ne sont évaluées que chez les mâles de la cohorte 1A.

57. Au moment du sacrifice, on note le poids des testicules et des épididymes de tous les mâles P et F1 (cohorte 1A). On conserve au moins un testicule et un épididyme pour l'examen histopathologique. L'épididyme non conservé sert à la numération des spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme (16) (17). Les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme (ou du canal déférent) sont par ailleurs récupérés d'une manière qui perturbe le moins possible l'évaluation de leur motilité et de leur morphologie (18).

58. La motilité des spermatozoïdes est évaluée immédiatement après le sacrifice ou enregistrée en vidéo en vue d'une analyse ultérieure. Le pourcentage de spermatozoïdes progressivement motiles peut être déterminé subjectivement ou objectivement grâce une analyse du mouvement assistée par ordinateur (19) (20) (21) (22) (23) (24). On conduira l'évaluation de la morphologie des spermatozoïdes à partir d'échantillons de sperme prélevés dans l'épididyme (ou le canal déférent) sous forme de préparations fixées ou en milieu humide (25). Au moins 200 spermatozoïdes par échantillon sont classés comme normaux (aussi bien la tête que la pièce intermédiaire et le flagelle paraissent normaux) ou anormaux. Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes comprennent, par exemple, la fusion, des têtes isolées et des têtes et/ou des queues déformées (26). Des têtes déformées ou larges peuvent indiquer des anomalies de la spermiation.

59. Si les échantillons de sperme sont congelés, les frottis fixés et les images de la motilité des spermatozoïdes enregistrées au moment de la nécropsie (27), les analyses ultérieures peuvent ne porter que sur les mâles ayant reçu des doses élevées et sur les mâles témoins. Toutefois, si l'on observe des effets liés au traitement, il faudra aussi évaluer les groupes traités aux doses plus faibles.

▼M5

Nécropsie macroscopique

60. Juste après le sacrifice ou le décès en cours d'étude, tous les animaux P et F1 subissent une nécropsie macroscopique destinée à mettre en évidence d'éventuelles anomalies structurelles ou altérations pathologiques. Il faut prêter une attention particulière aux organes de l'appareil reproducteur. Il convient de consigner les petits moribonds qui ont été euthanasiés et les petits morts et, s'ils ne sont pas macérés, de les examiner pour détecter d'éventuelles anomalies et/ou établir la cause de leur mort, et de les conserver.

61. Un frottis vaginal des femelles P et F1 adultes sera examiné le jour de la nécropsie pour déterminer le stade du cycle œstral et permettre d'établir des corrélations avec l'histopathologie des organes reproducteurs. On examinera les utérus de toutes les femelles P (et F1, le cas échéant) sans compromettre l'évaluation histopathologique, pour voir s'ils présentent des points d'implantation et les dénombrer.

Pesée des organes et conservation des tissus — Animaux adultes P et F1

62. Après le sacrifice, le poids corporel et le poids des organes énumérés ci-dessous de tous les animaux P et F1 adultes des cohortes concernées (voir ci-après) sont déterminés dès que possible après dissection pour éviter toute dessiccation. Il convient de préserver ensuite ces organes dans des conditions appropriées. Sauf mention contraire, les organes qui vont par paires peuvent être pesés individuellement ou ensemble, conformément aux habitudes du laboratoire.

— Utérus (dont oviductes et col), ovaires

— Testicules, épididymes (totalité et queue pour les échantillons servant à la numération des spermatozoïdes)

— Prostate (ensemble des parties dorsolatérale et ventrale). Il convient d'extraire très soigneusement les tissus adhérents de l'ensemble de la prostate pour éviter de percer les vésicules séminales remplies de liquide. Si le traitement a eu un effet sur le poids total de la prostate, on disséquera minutieusement les lobes dorsolatéral et ventral après les avoir fixés et pesés séparément.

— Vésicules séminales avec glandes coagulantes et leurs liquides (considérés comme une unité et pesés ensemble)

— Cerveau, foie, reins, cœur, rate, thymus, hypophyse, glande thyroïde (après fixation), glandes surrénales et organes ou tissus cibles connus.

63. Outre les organes mentionnés ci-dessus, on conservera, dans des conditions appropriées, des échantillons de nerf périphérique, muscle, colonne vertébrale, œil avec nerf optique, conduit gastro-intestinal, vessie, poumon, trachée (portant encore les glandes thyroïde et parathyroïdes), moelle osseuse, canal déférent (mâles), glandes mammaires (mâles et femelles) et vagin.

64. Tous les organes des animaux de la cohorte 1A sont pesés et conservés en vue de l'examen histopathologique.

65. Pour rechercher les effets immunotoxiques pré- et postnataux, 10 mâles et 10 femelles de la cohorte 1A issus de chaque groupe de traitement (1 mâle ou 1 femelle par portée; chaque portée représentée par au moins 1 petit; sélection au hasard) seront soumis aux examens suivants au moment du sacrifice:

— pesée des ganglions lymphatiques associés ou non à la voie d'exposition (en plus de la pesée des glandes surrénales, du thymus et de la rate, déjà effectuée pour tous les animaux de la cohorte 1A),

▼M5

— analyse des sous-populations lymphocytaires spléniques (lymphocytes T CD4+ et CD8+, lymphocytes B, et cellules tueuses naturelles NK) effectuée sur la moitié de la rate, l'autre moitié étant conservée en vue de l'examen histopathologique.

L'analyse des sous-populations lymphocytaires spléniques chez les animaux non immunisés (cohorte 1A) déterminera si l'exposition contribue à une modification de l'équilibre immunologique concernant la distribution des lymphocytes thymiques «auxiliaires» (CD4+) ou cytotoxiques (CD8+) ou des cellules tueuses naturelles (NK) (réponses rapides aux cellules néoplastiques et aux pathogènes).

66. Il convient de peser les organes suivants des animaux de la cohorte 1B et de traiter leurs tissus jusqu'à leur transformation en blocs:

— Vagin (non pesé)

— Utérus (dont col)

— Ovaires

— Testicules (au moins un)

— Épididymes

— Vésicules séminales et glandes coagulantes

— Prostate

— Hypophyse

— Organes cibles connus

L'examen histopathologique de la cohorte 1B ne sera conduit que si les résultats de la cohorte 1A sont équivoques ou que la substance administrée est présumée toxique pour la reproduction ou le système endocrinien.

67. Cohortes 2A et 2B: essai de neurotoxicité pour le développement (JPN 21 ou 22 et descendants adultes). Les animaux de la cohorte 2A sont sacrifiés après l'essai comportemental; leur cerveau est ensuite pesé et soumis à un examen neurohistopathologique complet à des fins d'évaluation de la neurotoxicité. Les animaux de la cohorte 2B sont sacrifiés au JPN 21 ou 22; leur cerveau est ensuite pesé et soumis à un examen microscopique pour évaluer la neurotoxicité. La fixation par perfusion est indispensable pour les animaux de la cohorte 2A et facultative pour ceux de la cohorte 2B, conformément à la méthode d'essai B.53 de l'OCDE (35).

Pesée des organes et conservation des tissus — Animaux F1 juste sevrés

68. Les petits non sélectionnés pour les cohortes, y compris les individus chétifs, sont sacrifiés après le sevrage, au JPN 22, sauf si les résultats indiquent que d'autres recherches in vivo s'imposent. Les petits euthanasiés sont soumis à une nécropsie macroscopique comprenant l'évaluation des organes reproducteurs, conformément aux paragraphes 62 et 63. Le cerveau, la rate et le thymus sont pesés et conservés dans des conditions appropriées pour un nombre maximal de 10 petits par sexe et par groupe, issus d'autant de portées que possible. De plus, on pourra conserver les tissus mammaires de ces petits mâles et femelles en vue d'analyses microscopiques supplémentaires ([1]) [voir document d'orientation n° 151 de l'OCDE (40)]. On conservera également les anomalies macroscopiques et les tissus cibles en vue d'un éventuel examen histologique.

([1]) Les recherches ont démontré que la glande mammaire, en particulier dans ses premiers stades de développement, constitue un critère d'évaluation valide de l'action œstrogénique. On recommande donc d'inclure dans la présente méthode d'essai, après validation, des paramètres d'évaluation fondés sur les glandes mammaires des petits des deux sexes.

▼M5

Histopathologie — Animaux P

69. Un examen histopathologique complet des organes énumérés aux paragraphes 62 et 63 est pratiqué sur l'ensemble des animaux P témoins ou ayant reçu une dose élevée. Il convient aussi d'examiner les organes qui présentent des modifications imputables à la substance d'essai chez tous les animaux traités avec des doses inférieures en vue de définir une CSENO. En outre, un examen histopathologique des organes reproducteurs et de toutes les lésions macroscopiques sera pratiqué sur tous les individus chez lesquels on soupçonne une diminution de la fertilité, par exemple ceux qui ne se sont pas accouplés, n'ont pas conçu, n'ont pas engendré ou n'ont pas donné naissance à des descendants sains, ou dont le cycle œstral ou le nombre, la motilité ou la morphologie des spermatozoïdes ont été affectés.

Histopathologie — Animaux F1

Animaux de la cohorte 1

70. Un examen histopathologique complet des organes énumérés aux paragraphes 62 et 63 est pratiqué sur l'ensemble des animaux adultes de la cohorte 1A témoins ou ayant reçu une dose élevée. Chaque portée est représentée par au moins un petit de chaque sexe. Il convient aussi d'examiner les organes et les tissus qui présentent des modifications imputables au traitement, ainsi que toutes les lésions macroscopiques, chez tous les animaux traités aux doses inférieures en vue de déterminer une CSENO. L'évaluation des effets pré- et postnataux sur les ganglions lymphatiques requiert un examen histopathologique des ganglions lymphatiques et de la moelle osseuse pratiqué sur 10 mâles et 10 femelles de la cohorte 1A, en plus de l'examen histopathologique du thymus, de la rate et des glandes surrénales déjà effectué sur tous les animaux 1A.

71. Les tissus reproducteurs et endocriniens de l'ensemble des individus de la cohorte 1B sont traités pour être transformés en blocs. Comme mentionné au paragraphe 66, les organes reproducteurs et endocriniens des animaux de la cohorte 1B subissent un examen histopathologique en cas de suspicion de toxicité pour la reproduction ou le système endocrinien. Il convient aussi de soumettre la cohorte 1B à un examen histologique si les résultats de la cohorte 1A sont équivoques.

72. Les ovaires des femelles adultes doivent contenir des follicules primordiaux et des follicules en croissance, ainsi que les grands corps jaunes; l'examen histopathologique des femelles F1 vise donc à quantifier les follicules primordiaux, les petits follicules en croissance et les grands corps jaunes; il convient que le nombre d'animaux, le choix de la section ovarienne et la taille des échantillons de section soient statistiquement appropriés à la méthode d'évaluation employée. Il est possible de procéder d'abord à la numération folliculaire des animaux témoins et traités à la dose élevée; si l'examen de ces derniers révèle un effet nocif, on étendra l'évaluation aux individus ayant reçu les doses inférieures. L'examen inclut la numération des follicules primordiaux, lesquels peuvent être combinés à de petits follicules en croissance, à des fins de comparaison entre les ovaires des femelles traitées et témoins [voir document d'orientation n° 151 de l'OCDE (40)]. L'évaluation des grands corps jaunes s'effectue parallèlement à l'essai de cyclicité œstrale de sorte que l'étape du cycle puisse être prise en compte. On vérifiera le développement spécifique correct des oviductes, de l'utérus et du vagin.

73. Un examen histopathologique détaillé des testicules sera pratiqué sur les mâles F1 afin de mettre en évidence des effets liés au traitement sur la différenciation et le développement des testicules, et sur la spermatogenèse (38). Quand c'est possible, des coupes du rete testis seront examinées. On vérifiera le développement spécifique normal de la tête, du corps et de la queue de l'épididyme ainsi que du canal déférent, et on évaluera les paramètres requis pour les mâles P.

▼M5

Animaux de la cohorte 2

74. Un examen neurohistopathologique est pratiqué sur tous les animaux de la cohorte 2A témoins et traités à dose élevée, par sexe, juste après le test neurocomportemental (après le JPN 75, mais pas au-delà du JPN 90). L'examen histopathologique du cerveau est effectué sur tous les animaux de la cohorte 2B témoins et traités à dose élevée, par sexe, au JPN 21 ou 22. Il convient aussi d'examiner les organes ou tissus qui présentent des modifications imputables à la substance d'essai chez les animaux traités avec des doses inférieures en vue de déterminer une CSENO. Pour les animaux des cohortes 2A et 2B, plusieurs coupes du cerveau sont réalisées afin d'examiner les bulbes olfactifs, le cortex cérébral, l'hippocampe, les ganglions de la base, le thalamus, l'hypothalamus, le mésencéphale (tectum, tegmentum et pédoncules cérébraux), le tronc cérébral et le cervelet. Seule la cohorte 2A subira par ailleurs un examen des yeux (rétine et nerf optique) et d'échantillons de nerf périphérique, muscle et colonne vertébrale. Tous les protocoles neurohistologiques sont conformes à la méthode d'essai B.53 (35).

75. Des parties représentatives du cerveau (coupes homologues soigneusement sélectionnées grâce à des repères microscopiques fiables) seront soumises à un examen morphométrique (quantitatif), qui pourra inclure des mesures linéaires et/ou surfaciques de régions spécifiques du cerveau. On réalisera au moins trois coupes consécutives pour chaque repère morphologique (niveau) en vue de sélectionner ensuite la coupe la plus homologue et représentative de la région spécifique du cerveau à analyser. Les neuropathologistes devront juger si les coupes préparées pour les mesures sont homologues aux autres échantillons du lot et si elles peuvent donc être examinées, dans la mesure où les mesures linéaires, en particulier, sont susceptibles de changer sur une distance relativement faible (28). Les coupes jugées non homologues sont exclues. L'objectif est de prélever des échantillons sur tous les animaux réservés à cet effet (10/sexe/niveau de dose), mais un nombre inférieur demeure acceptable. Toutefois, des échantillons prélevés sur moins de 6 animaux/sexe/niveau de dose ne seront en principe pas considérés comme suffisants pour répondre aux objectifs de la présente méthode d'essai. La stéréologie peut permettre d'identifier des effets liés au traitement sur des paramètres tels que le volume ou le nombre de cellules de régions neuroanatomiques spécifiques. Tous les aspects de la préparation des échantillons de tissus, depuis la fixation de tissus jusqu'à la dissection des échantillons de tissus, au traitement des tissus et à la coloration des lames, devront se conformer à un modèle expérimental équilibré tel que chaque lot contienne des échantillons représentatifs de chaque groupe de dose. En cas de recours aux analyses morphométriques ou stéréologiques, les tissus cérébraux sont inclus dans un milieu approprié, simultanément pour toutes les doses, afin d'éviter les artefacts de rétrécissement associés à un stockage prolongé dans le fixateur.

RAPPORT

Résultats

76. Les résultats sont rapportés individuellement et résumés sous forme de tableaux. S'il y a lieu, on présentera les informations suivantes pour chaque groupe d'essai et chaque génération: nombre d'animaux présents au début de l'essai, nombre d'animaux décédés durant l'essai ou euthanasiés, moment du décès ou de l'euthanasie, nombre d'animaux fertiles, nombre de femelles gravides, nombre de femelles donnant naissance à une portée, et nombre d'animaux manifestant des signes de toxicité. Le rapport contient aussi une description de la toxicité, y compris le moment d'apparition des effets toxiques, leur durée et leur sévérité.

77. On évaluera les résultats numériques à l'aide d'une méthode statistique appropriée et acceptée. Les méthodes statistiques font partie intégrante de la méthodologie de l'essai et sont choisies comme telles; elles traitent de façon pertinente les données non normales (par exemple les résultats des numérations), les données tronquées (par exemple en raison d'un temps

▼M5

d'observation limité), la non-indépendance (par exemple les effets sur les portées et les mesures répétées) et les variances inégales. Les modèles linéaires généralisés mixtes et les modèles dose-effet couvrent un large éventail d'outils d'analyse qui peuvent convenir au traitement des résultats dans le cadre de la présente méthode d'essai. Le rapport fournit suffisamment d'informations sur la méthode d'analyse et le logiciel employés pour qu'un réviseur ou un statisticien indépendant puissent évaluer/réévaluer l'analyse.

Évaluation des résultats

78. Les résultats sont évalués en fonction des effets observés, notamment à la nécropsie et lors des examens microscopiques. L'évaluation porte notamment sur la relation ou l'absence de relation entre la dose et la présence, la fréquence et la gravité des anomalies, notamment des lésions macroscopiques. Elle porte aussi sur les organes cibles, la fertilité, les anomalies cliniques, la capacité reproductrice et les portées, les modifications du poids corporel, la mortalité et autres effets toxiques et affectant le développement. Les modifications spécifiques à chaque sexe font l'objet d'une attention particulière. Les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai et, le cas échéant, les données toxicocinétiques, y compris le transfert dans le placenta et l'excrétion dans le lait, sont prises en considération lors de l'évaluation des résultats.

Rapport d'essai

79. Le rapport d'essai comporte les informations énumérées ci-après, obtenues dans la présente étude à partir des animaux P, F1 et F2 (le cas échéant):

Substance d'essai

— Toutes les informations pertinentes disponibles concernant la substance d'essai et ses propriétés toxicocinétiques et toxicodynamiques

— Données d'identification

— Pureté

Véhicule (s'il y a lieu)

— Justification du choix du véhicule s'il ne s'agit pas d'eau

Animaux d'essai

— Espèces/souches utilisées

— Nombre, âge et sexe

— Source, conditions d'encagement, régime alimentaire, matériaux de nidification, etc.

— Poids de chaque animal au début de l'essai

— Résultats des frottis vaginaux des femelles P avant le début du traitement (si ces examens ont été pratiqués à ce moment-là)

— Données sur l'accouplement de la génération P, précisant les partenaires mâles et femelles du couple, et le succès de l'accouplement

— Portée d'origine des adultes de la génération F1

Conditions d'essai

— Justification de la sélection des doses appliquée

— Détails concernant la préparation de la substance d'essai ou son incorporation aux aliments, ainsi que la concentration obtenue

▼**M5**

— Stabilité et homogénéité de la préparation dans le véhicule ou le milieu d'administration (par exemple la nourriture, l'eau de boisson), dans le sang et/ou le lait, dans les conditions d'utilisation et de stockage entre les utilisations

— Détails sur l'administration de la substance d'essai

— Conversion de la concentration de la substance d'essai (ppm) dans la nourriture ou l'eau de boisson en dose administrée (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu

— Détails concernant la qualité des aliments et de l'eau (y compris la composition de la nourriture, si possible)

— Description détaillée des protocoles de randomisation utilisés pour sélectionner les petits éliminés de la portée, et pour affecter les petits aux groupes d'essai

— Conditions environnementales

— Liste du personnel impliqué dans l'étude, mentionnant leur formation professionnelle

Résultats (récapitulatif et données individuelles par sexe et par dose)

— Consommation de nourriture, consommation d'eau (si disponible), efficacité alimentaire (gain de poids corporel par gramme de nourriture consommé, sauf lors de la cohabitation et de l'allaitement), et consommation de la substance d'essai (en cas d'administration dans la nourriture/l'eau de boisson) pour les animaux P et F1

— Données relatives à l'absorption (si disponibles)

— Poids corporel des animaux P

— Poids corporel des animaux F1 sélectionnés juste après le sevrage

— Temps de survie pendant l'étude ou indication de la survie des animaux à la fin de l'expérience

— Nature, sévérité et durée des signes cliniques (qu'ils soient réversibles ou non)

— Résultats des analyses hématologique, d'urine et de chimie clinique, y compris dosage des TSH et T4

— Analyse phénotypique des cellules spléniques (lymphocytes T, B, cellules NK)

— Cellularité de la moelle osseuse

— Données sur les effets toxiques

— Nombre de femelles P et F1 présentant une durée de cycle ou un cycle œstral normal ou anormal

— Moment de la copulation (intervalle précoïtal, soit nombre de jours entre l'accouplement et la copulation)

— Effets toxiques ou autres sur la reproduction, y compris nombre et pourcentage d'animaux qui ont copulé, sont gravides, ont mis bas et allaité, de mâles déclenchant une gravidité, de femelles présentant des signes de dystocie ou de mise bas prolongée ou difficile

— Durée de la gestation et, lorsque c'est possible, de la parturition

— Nombre d'implantations, taille de la portée et pourcentage de petits mâles

— Nombre et pourcentage de pertes postimplantation, de naissances vivantes et de mort-nés

▼**M5**

— Poids des portées et poids des petits (mâles, femelles et poids global), nombre d'individus chétifs, s'il est établi

— Nombre de petits affectés d'anomalies macroscopiques

— Effets toxiques ou autres sur la descendance, la croissance postnatale, la viabilité, etc.

— Repères physiques relevés sur les petits et autres données sur le développement postnatal

— Informations relatives à la maturité sexuelle des animaux F1

— Observations fonctionnelles réalisées selon les besoins sur les petits et les adultes

— Poids corporel au moment du sacrifice, et poids absolu et relatif des organes des adultes P et F1

— Résultats de la nécropsie

— Description détaillée de toutes les observations histopathologiques

— Nombre total de spermatozoïdes dans la queue de l'épididyme, pourcentage de spermatozoïdes progressivement motiles, pourcentage de spermatozoïdes de morphologie normale, et pourcentage de spermatozoïdes correspondant à chaque anomalie identifiée pour les mâles P et F1

— Nombre et stades de maturation des follicules contenus dans les ovaires des femelles P et F1, le cas échéant

— Numération des grands corps jaunes dans les ovaires des femelles F1

— Traitement statistique des résultats, le cas échéant

Paramètres de la cohorte 2

— Description détaillée des protocoles utilisés pour standardiser les observations et les protocoles, et définitions du mode opératoire de notation des observations

— Liste de tous les protocoles d'essai utilisés, et justification de leur choix

— Précisions sur les protocoles comportementaux/fonctionnels, neuropathologiques et morphométriques utilisés, y compris informations et détails concernant les appareils automatisés

— Protocoles d'étalonnage et de vérification de l'équivalence des appareils et de la répartition équilibrée des groupes de traitement dans les protocoles d'essai

— Brève justification explicitant les éventuelles décisions impliquant une appréciation professionnelle

— Description détaillée de toutes les observations comportementales/fonctionnelles, neuropathologiques et morphométriques par sexe et par groupe de dose, y compris augmentations et diminutions par rapport aux témoins

— Poids du cerveau

— Tout diagnostic, réalisé sur la base de signes et de lésions neurologiques, y compris maladies ou affections d'origine naturelle

— Images d'observations représentatives

— Images à faible grossissement permettant d'évaluer l'homologie des coupes utilisées pour la morphométrie

▼M5

— Traitement statistique des résultats, notamment modèles statistiques employés pour analyser les données, et résultats, qu'ils soient significatifs ou non

— Lien entre chaque effet toxique et la conclusion proposée sur le potentiel neurotoxique de la substance d'essai, par sexe et par groupe de dose

— Répercussions de toutes les informations toxicocinétiques sur les conclusions

— Données démontrant la fiabilité et la sensibilité de la méthode de l'essai (c'est-à-dire, résultats des témoins positifs et historiques)

— Relations éventuelles entre les effets neuropathologiques et fonctionnels

— CSENO ou dose de référence pour les mères et les petits, par sexe et groupe de dose

— Discussion sur l'interprétation générale des données sur la base des résultats, dont une conclusion indiquant si la substance chimique est responsable ou non d'une neurotoxicité pour le développement, et précisant la CSENO

Paramètres de la cohorte 3

— Concentration sérique des anticorps IgM (sensibilisation avec GRM ou KLH), ou nombre de CFP dans la rate en réponse aux IgM (sensibilisation avec GRM)

— Confirmation de la performance de l'essai de réponse anticorps dépendante des lymphocytes T dans le cadre du processus d'optimisation par le laboratoire qui conduit l'essai pour la première fois, puis périodiquement (par exemple tous les ans) par l'ensemble des laboratoires

— Discussion sur l'interprétation générale des données sur la base des résultats, dont une conclusion indiquant si la substance chimique est responsable ou non d'une immunotoxicité pour le développement, et précisant la CSENO

Discussion des résultats

Conclusions, y compris CSENO concernant les parents et les descendants

Toutes les informations ne résultant pas de l'étude mais utiles pour interpréter les résultats (par exemple similitude des effets avec ceux d'autres neurotoxiques connus), sont également fournies.

Interprétation des résultats

80. L'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération fournit des informations sur les effets de l'exposition répétée à une substance chimique durant toutes les phases du cycle de reproduction, si besoin est. Elle livre notamment des informations sur l'appareil reproducteur et sur divers paramètres d'évaluation des effets sur le développement, la croissance, la survie et les fonctions des descendants jusqu'au JPN 90.

81. L'interprétation des résultats de cette étude tient compte de toutes les informations disponibles sur la substance chimique, notamment ses propriétés physico-chimiques, toxicocinétiques et toxicodynamiques, les données pertinentes disponibles sur les analogues de structure et les résultats des études de toxicité antérieures sur la substance d'essai (par exemple toxicité aiguë, toxicité après application répétée, études mécanistiques et études visant à repérer d'éventuelles différences qualitatives et quantitatives des propriétés métaboliques in vivo/in vitro d'une espèce à une autre). Il convient, si possible, d'interpréter les résultats de la nécropsie macroscopique et de la pesée des organes à la lumière des observations effectuées dans d'autres études à doses répétées. On pourra éventuellement expliquer le ralentissement de la croissance des descendants par une influence de la substance d'essai sur la composition du lait (29).

▼M5

Cohorte 2 (neurotoxicité pour le développement)

82. Les résultats des évaluations neurocomportementales et neuropathologiques sont interprétés à la lumière de tous les effets observés, selon une démarche fondée sur le poids de la preuve et le jugement d'experts. Il convient d'inclure dans la discussion les types d'effets comportementaux ou morphologiques éventuellement observés, ainsi que les preuves d'une relation dose-effet. Cette caractérisation devra englober l'évaluation de la neurotoxicité pour le développement, provenant notamment d'études épidémiologiques sur l'homme ou de rapports d'études de cas et d'études animales expérimentales (par exemple données toxicocinétiques, informations sur la relation structure-activité, données issues d'autres études de toxicité). L'évaluation des résultats comprendra une discussion analysant la signification biologique et la signification statistique. Elle inclura, le cas échéant, la relation entre les altérations neuropathologiques et comportementales observées. Pour orienter l'interprétation des résultats relatifs à la neurotoxicité pour le développement, voir la méthode d'essai B.53 de l'OCDE (35) et l'article de Tyl e.a. de 2008 (31).

Cohorte 3 (immunotoxicité pour le développement)

83. La suppression ou la stimulation de la fonction immune évaluée par l'essai de réponse anticorps dépendant des lymphocytes T est interprétée à la lumière de l'ensemble des observations effectuées. La signification des résultats de cet essai pourrait être appuyée par d'autres effets sur divers indicateurs associés aux facteurs immunologiques (comme la cellularité de la moelle osseuse, le poids et l'histopathologie des tissus lymphoïdes, la distribution des sous-populations lymphocytaires). Les effets mis en évidence par l'essai de réponse anticorps dépendant des lymphocytes T sont susceptibles d'être moins significatifs quand d'autres toxicités se manifestent à des concentrations d'exposition inférieures.

84. Pour l'interprétation des résultats des études de la toxicité pour la reproduction et de la neurotoxicité, il est recommandé de consulter le document d'orientation n° 43 de l'OCDE (26).

BIBLIOGRAPHIE

(1) Cooper, R.L., Lamb, J.C., Barlow, S.M., Bentley, K., Brady, A.M., Doerr, N., Eisenbrandt, D.L., Fenner-Crisp, P.A., Hines, R.N., Irvine, L.F.H., Kimmel, C.A., Koeter, H., Li, A.A., Makris, S.L., Sheets, L.P., Speijers, G.J.A., et Whitby, K.E. (2006), 'A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment', Critical Reviews in Toxicology, 36, 69-98.

(2) Thigpen, J.E., Setchell, K.D.R., Ahlmark, K.B., Locklear, J., Spahr, T., Leviness, G.F., Goelz, M.F., Haseman, J.K., Newbold, R.R., et Forsythe, D.B. (1999), 'Phytœstrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets', Lab. Anim. Sci., 49, 530-536.

(3) Zoetis, T., et Walls, I. (2003), Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research, ILSI Press, Washington DC.

(4) Moser, V.C., Walls, I., et Zoetis, T. (2005), 'Direct Dosing of Preweaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group', International Journal of Toxicology, 24, 87-94.

(5) Conolly, R.B., Beck, B.D., et Goodman, J.I. (1999), 'Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment', Toxicological Sciences, 49, 1-4.

(6) Ulbrich, B., et Palmer, A.K. (1995), 'Detection of Effects on Male Reproduction — a Literature Survey', Journal of the American College of Toxicologists, 14, 293-327.

(7) Mangelsdorf, I., Buschmann, J., et Orthen, B. (2003), 'Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility', Regulatory Toxicology and Pharmacology, 37, 356-369.

▼M5

(8) Sakai, T., Takahashi, M., Mitsumori, K., Yasuhara, K., Kawashima, K., Mayahara, H., et Ohno, Y. (2000), 'Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats — overview of the studies', Journal of Toxicological Sciences, 25, 1-21.

(9) Creasy, D.M. (2003), 'Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology', Birth Defects Research, Part B, 68, 408-415.

(10) Goldman, J.M., Murr, A.S., Buckalew, A.R., Ferrell, J.M., et Cooper, R.L. (2007), 'The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies', Birth Defects Research, Part B, 80(2), 84-97.

(11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), 'Cycles and Seasons', in Auston, C.R., et Short, R.V. (eds), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(12) Gallavan, R.H. Jr, Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., et Reynolds, V.L. (1999), 'Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights', Reproductive Toxicology, 13:383-390.

(13) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., et Weiner, R.I. (1977), 'Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat', Biological Reproduction, 17, 298-303.

(14) Ladics, G.S. (2007), 'Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing', Methods, 41, 9-19.

(15) Gore, E.R., Gower, J., Kurali, E., Sui, J.L., Bynum, J., Ennulat, D., et Herzyk, D.J. (2004), 'Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation', Toxicology, 197, 23-35.

(16) Gray, L.E., Ostby, J., Ferrell, J., Rehnberg, G., Linder, R., Cooper, R., Goldman, J., Slott, V., et Laskey, J. (1989), 'A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat', Fundamental and Applied Toxicology, 12, 92-108.

(17) Robb, G.W., Amann, R.P., et Killian, G.J. (1978), 'Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats', Journal of Reproduction and Fertility, 54, 103-107.

(18) Klinefelter, G.R., Gray, L.E. Jr, et Suarez, J.D. (1991), 'The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat', Reproductive Toxicology, 5, 39-44.

(19) Seed, J., Chapin, R.E., Clegg, E.D., Dostal, L.A., Foote, R.H., Hurtt, M.E., Klinefelter, G.R., Makris, S.L., Perreault, S.D., Schrader, S., Seyler, D., Sprando, R., Treinen, K.A., Veeramachaneni, D.N., et Wise, L.D. (1996), 'Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report', Reproductive Toxicology, 10, 237-244.

(20) Chapin, R.E., Filler, R.S., Gulati, D., Heindel, J.J., Katz, D.F., Mebus, C.A., Obasaju, F., Perreault, S.D., Russell, S.R., et Schrader, S. (1992), 'Methods for Assessing Rat Sperm Motility', Reproductive Toxicology, 6, 267-273.

(21) Klinefelter, G.R., Roberts, N.L., et Suarez, J.D. (1992), 'Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an In Vitro Demonstration', Journal of Andrology, 13, 409-421.

(22) Slott, V.L., Suarez, J.D., et Perreault, S.D. (1991), 'Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations', Reproductive Toxicology, 5, 449-458.

▼**M5**

(23) Slott, V.L., et Perreault, S.D. (1993), ‘Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer’, Methods in Toxicology, Part A, Academic, Orlando, Florida. p. 319-333.

(24) Toth, G.P., Stober, J.A., Read, E.J., Zenick, H., et Smith, M.K. (1989), ‘The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations’, Journal of Andrology, 10, 401-415.

(25) Linder, R.E., Strader, L.F., Slott, V.L., et Suarez, J.D. (1992), ‘Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants’, Reproductive Toxicology, 6, 491-505.

(26) OCDE (2008), Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OCDE, Paris.

(27) Working, P.K., et Hurtt, M. (1987), ‘Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility’, Journal of Andrology, 8, 330-337.

(28) Bolin, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), ‘A 'Best Practices' Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing — for Today’, Toxicological Pathology, 34, 296-313.

(29) Stütz, N., Bongiovanni, B., Rassetto, M., Ferri, A., Evangelista de Duffard, A.M., et Duffard, R. (2006), ‘Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components’, Food Chemicals Toxicology, 44, 8-16.

(30) Thigpen, JE, Setchell, K.D.R., Haseman, J.K., Saunders, H.E., Caviness, G.F., Kissling, G.E., Grant, M.G., et Forsythe, D.B. (2007), ‘Variations in Phytœstrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats’, Environmental Health Perspectives, 115(12), 1717-1726.

(31) Tyl, R.W., Crofton, K., Moretto, A., Moser, V., Sheets, L.P., et Sobotka, T.J. (2008), ‘Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints’, Neurotoxicology and Teratology, 30:349-381.

(32) OCDE (1996), Étude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement, Ligne directrice n° 422 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.

(33) Chapitre B.43 de la présente annexe, «Étude de neurotoxicité sur les rongeurs».

(34) OCDE (2000), Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(35) Chapitre B.53 de la présente annexe, «Étude de neurotoxicité pour le développement».

(36) Chapitre B.54 de la présente annexe, «Bioessai utérotrophique chez les rongeurs: essai de dépistage à court terme des propriétés œstrogéniques».

(37) Chapitre B.55 de la présente annexe, «Bioessai de Hershberger sur le rat: essai de dépistage à court terme de propriétés (anti)androgéniques».

▼**M5**

(38) OCDE (2009), Guidance Document for Histologic Evalution of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, No. 106, OCDE, Paris.

(39) OCDE (2011), Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2009)21, OCDE, Paris.

(40) OCDE (2013), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OCDE, Paris.

▼**M5**

Appendice 1

Mesures et observations incluses dans la batterie d'observations fonctionnelles (cohorte 2A)

Cage d'hébergement et plan ouvert	Manipulation	Physiologie
Posture	Facilité à saisir	Température
Mouvements spasmodiques et contractures involontaires	Facilité à manipuler	Poids corporel
Fermeture palpébrale	Tonicité musculaire	Réflexe pupillaire
Piloérection	Réponse à l'approche	Taille de la pupille
Salivation	Réponse au toucher	
Larmoiement	Réponse auditive	
Vocalisations	Réponse au pincement de la queue	
Cabrage	Réflexe de redressement	
Démarche anormale	Étalement du pied posé sur le sol	
Éveil	Force de préhension des pattes antérieures	
Stéréotypie	Force de préhension des pattes postérieures	
Comportement bizarre		
Taches		
Respiration anormale		

▼**M5**

Appendice 2

DÉFINITIONS

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼M5

B.57. ESSAI DE STEROÏDOGENESE H295R

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice pour les essais de produits chimiques n° 456 (2011) de l'OCDE. L'OCDE a lancé en 1998 une activité à caractère hautement prioritaire visant à réviser les lignes directrices existantes ou à en établir de nouvelles concernant le dépistage et l'essai des substances susceptibles d'avoir des effets perturbateurs sur le système endocrinien. Le «Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des produits chimiques perturbateurs endocriniens» de 2002 comprend cinq niveaux, chacun d'entre eux correspondant à un degré de complexité biologique différent (1). L'essai de stéroïdogenèse H295R in vitro (H295R) décrit dans la présente méthode d'essai utilise une lignée cellulaire H295R de carcinome surrénalien humain (cellules NCI-H295R) et constitue un «essai in vitro fournissant des données mécanistiques» de niveau 2, à des fins de détection et de hiérarchisation. Le développement et la normalisation de l'essai en tant que détecteur des effets des substances chimiques sur la stéroïdogenèse, et en particulier la production de 17β-estradiol (E2) et de testostérone (T), ont été réalisés en plusieurs étapes. L'essai H295R a été optimisé et validé (2) (3) (4) (5).

2. L'essai de stéroïdogenèse H295R a pour but de détecter les substances chimiques qui influent sur la production d'E2 et de T. Il vise à identifier les xénobiotiques qui ont pour site(s) cible(s) les composantes endogènes constituant la voie biochimique intracellulaire qui conduit, par une suite de réactions, du cholestérol à la production d'E2 et/ou de T. L'essai H295R ne vise pas à identifier les substances qui influent sur la stéroïdogenèse en raison de leurs effets sur l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique (HHG). Il a pour but d'indiquer si, oui ou non, une substance chimique est susceptible d'induire ou d'inhiber la production de T et d'E2; il est toutefois possible d'obtenir des résultats quantitatifs dans certains cas (voir paragraphes 53 et 54). Les résultats de l'essai s'expriment par des changements relatifs de la production hormonale par comparaison avec les témoins solvant (TS). L'essai ne vise pas à fournir des informations mécanistiques spécifiques concernant l'interaction de la substance d'essai avec le système endocrinien. Des recherches ont été conduites au moyen de la lignée cellulaire afin de déterminer les effets sur des enzymes et des hormones intermédiaires particulières comme la progestérone (2).

3. Les définitions et abréviations utilisées dans cette méthode d'essai sont présentées à l'appendice. Un protocole détaillé comprenant des instructions sur la façon de préparer les solutions, de cultiver les cellules et d'effectuer divers aspects de l'essai est présenté dans les appendices I à III du document Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production de l'OCDE (4).

CONSIDÉRATIONS INITIALES ET LIMITATIONS

4. Cinq enzymes différentes catalysant six réactions différentes interviennent dans la biosynthèse des hormones stéroïdiennes sexuelles. La conversion enzymatique du cholestérol en prégnénolone par l'enzyme de coupure de la chaîne latérale du cholestérol (CYP11A) liée au cytochrome P450 (CYP) constitue l'étape initiale d'une série de réactions biochimiques qui aboutissent à la synthèse des hormones stéroïdiennes finales. Selon l'ordre des deux réactions suivantes, la stéroïdogenèse se divise en deux voies, la voie Δ^5-hydroxystéroïde et la voie Δ^4-cétostéroïde, qui convergent dans la production d'androstènedione (figure 1).

5. L'androstènedione est convertie en testostérone (T) par la 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase (17ß-HSD). La testostérone est à la fois une hormone intermédiaire et une hormone finale. Chez les sujets masculins, la T peut être convertie en dihydrotestostérone (DHT) par la 5α-réductase, qui se trouve dans les membranes cellulaires, l'enveloppe nucléaire et le réticulum endoplasmique de tissus cibles de l'action androgénique comme la prostate et les vésicules séminales. La DHT est un androgène nettement plus puissant que la T et elle est aussi considérée comme une hormone finale. L'essai H295R ne mesure pas la DHT (voir paragraphe 10).

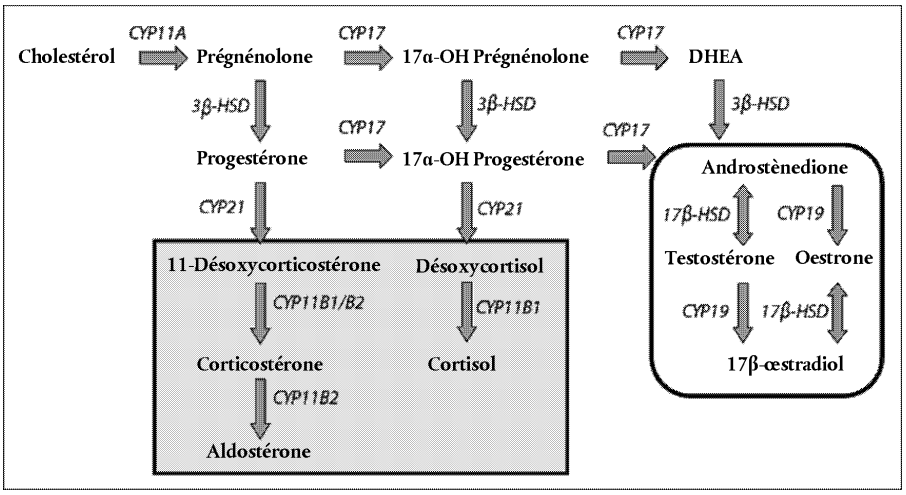
▼M5

6. L'enzyme de la voie stéroïdogénique qui convertit les substances androgéniques en substances œstrogéniques est l'aromatase (CYP19). La CYP19 convertit la T en 17ß-estradiol (E2) et l'androstènedione en œstrone. L'E2 et la T sont considérés comme des hormones finales de la voie stéroïdogénique.

7. La spécificité de l'activité de lyase de la CYP17 diffère entre les espèces pour les substrats intermédiaires. Chez l'homme, l'enzyme favorise les substrats de la voie Δ^5-hydroxystéroïde (prégnénolone), alors que les substrats de la voie Δ^4-cétostéroïde (progestérone) sont favorisés chez le rat (19). Ces différences dans l'activité de lyase de la CYP17 expliquent peut-être certaines différences entre les espèces dans la réponse aux substances qui altèrent la stéroïdogenèse in vivo (6). Les cellules H295 ont montré qu'elles reflétaient très fidèlement l'expression de l'enzyme surrénalienne chez l'homme adulte et le schéma de production de stéroïdes (20), mais on sait qu'elles expriment les enzymes des voies Δ^5-hydroxystéroïde et Δ^4-cétostéroïde pour la synthèse des androgènes (7) (11) (13) (15).

Figure 1

Voie stéroïdogénique dans les cellules H295R



Note:

Les enzymes sont en italique, les hormones en gras et les flèches indiquent la direction de la synthèse. Le fond grisé indique les voies/produits de la catégorie des corticostéroïdes. Les voies/produits de la catégorie des stéroïdes sexuels sont entourés d'une courbe. CYP = cytochrome P450; HSD = hydroxystéroïde déshydrogénase; DHEA = déhydroépiandrostérone.

8. La lignée cellulaire H295R de carcinome surrénalien humain est un modèle in vitro utile pour l'étude des effets sur la synthèse des hormones stéroïdes (2) (7) (8) (9) (10). La lignée cellulaire H295R exprime les gènes qui codent toutes les enzymes clés pour la stéroïdogenèse mentionnées ci-dessus (11) (15) (figure 1). C'est là une propriété unique car l'expression in vivo de ces gènes est spécifique au tissu et au stade de développement: typiquement, aucun tissu ou stade de développement n'exprime à lui seul tous les gènes intervenant dans la stéroïdogenèse (2). Les cellules H295R ont les caractéristiques physiologiques de cellules surrénaliennes fœtales humaines zonalement indifférenciées (11). Ces cellules représentent un système in vitro unique en ce qu'elles ont la capacité de produire toutes les hormones stéroïdes qu'on trouve dans le cortex surrénalien adulte et dans les gonades, et permettent de tester les effets sur la synthèse des corticostéroïdes et sur la production d'hormones stéroïdes sexuelles comme les androgènes et œstrogènes, bien que l'essai n'ait été validé que pour la détection de la T et de l'E2. Les changements enregistrés par le système

▼M5

d'essai sous la forme d'une altération de la production de T et d'E2 peuvent être le résultat d'une multitude d'interactions différentes des substances d'essai avec les fonctions stéroïdogéniques exprimées par les cellules H295R. Cela inclut la modulation de l'expression, de la synthèse ou de la fonction des enzymes intervenant dans la production, la transformation ou l'élimination des hormones stéroïdes (12) (13) (14). L'inhibition de la production d'hormones peut être due à une liaison compétitive directe avec une enzyme dans la voie de synthèse, à l'impact sur des cofacteurs comme la NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) et l'AMPc (Adénosine monophosphate cyclique), et/ou à l'augmentation du métabolisme des stéroïdes ou la suppression de l'expression génique de certaines enzymes dans la voie de la stéroïdogenèse. Si l'inhibition peut être fonction de processus aussi bien directs qu'indirects intervenant dans la production des hormones, l'induction agit typiquement de manière indirecte, par exemple en touchant des cofacteurs comme la NADPH et l'AMPc (comme dans le cas de la forskoline), en diminuant le métabolisme des stéroïdes (13) et/ou en régulant positivement l'expression des gènes stéroïdogéniques.

9. L'essai H295R présente plusieurs avantages:

— il permet de détecter aussi bien les augmentations que les diminutions de la production de T et d'E2,

— il permet d'apprécier directement l'impact potentiel d'une substance chimique sur la viabilité des cellules/la cytotoxicité. C'est là un trait important qui permet de faire la distinction entre les effets dus à la cytotoxicité et ceux dus à l'interaction directe des produits chimiques avec les voies stéroïdogéniques, ce qui n'est pas possible dans les systèmes d'explants de tissus composés de multiples types de cellules de sensibilité et fonctionnalité variables,

— il ne nécessite pas l'utilisation d'animaux,

— la lignée de cellules H295R est commercialement disponible.

10. Les principales limites de l'essai sont les suivantes:

— sa capacité métabolique est inconnue mais probablement assez limitée; en conséquence, l'essai ne détectera probablement pas les substances qui doivent être métaboliquement activées,

— étant dérivée de tissu surrénal, la H295R possède les enzymes capables de produire aussi bien les hormones glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes que les hormones sexuelles; en conséquence, les effets sur la production de glucocorticoïdes et de minéralocorticoïdes peuvent influer sur les niveaux de T et d'E2 observés dans l'essai,

— il ne mesure pas la DHT et ne permet donc pas de détecter les substances inhibant la 5α- réductase, auquel cas on peut utiliser l'essai de Hershberger (16),

— l'essai H295R ne détecte pas les substances qui interfèrent avec la stéroïdogenèse en affectant l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG), ce qui ne peut être étudié que chez des animaux intacts.

PRINCIPE DE L'ESSAI

11. L'essai a pour but la détection des substances chimiques qui influent sur la production de T et d'E2. La T est aussi un intermédiaire dans la voie de production de l'E2. L'essai peut détecter les produits chimiques qui inhibent ou induisent typiquement les enzymes de la voie de la stéroïdogenèse.

▼M5

12. L'essai s'effectue habituellement dans des conditions de culture cellulaire standard, sur des plaques de culture à 24 puits. On peut aussi utiliser d'autres tailles de plaque pour réaliser l'essai; toutefois, les conditions d'ensemencement et les conditions expérimentales sont ajustées en conséquence pour maintenir la conformité aux critères de performance.

13. Après une période d'acclimatation de 24 heures dans les plaques de culture multipuits, les cellules sont exposées pendant 48 heures à 7 concentrations de la substance d'essai, au moins en triplicat. Le solvant ainsi qu'un inhibiteur et un inducteur connus de la production des hormones sont employés à une concentration fixe comme témoins négatifs et positifs. À la fin de la période d'exposition, on retire le milieu de chaque puits. Immédiatement après avoir enlevé le milieu, on analyse la viabilité des cellules de chaque puits. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour mesurer la concentration des hormones dans le milieu, notamment les trousses commerciales de dosage des hormones ou des techniques instrumentales comme les systèmes combinés de chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse (CPL-SM). Les données sont exprimées sous la forme d'un facteur multiplicatif de changement (fold change) par rapport au témoin solvant et d'une concentration minimale avec effet observé (CMEO). Si l'essai est négatif, la plus forte concentration testée est indiquée sous la dénomination de «concentration sans effet observé» (CSEO). Les conclusions concernant la capacité d'une substance chimique d'influer sur la stéroïdogenèse reposent sur au moins deux exécutions de l'essai indépendantes. La première peut servir à déterminer les ordres de grandeur de concentrations avec un ajustement ultérieur de ces concentrations pour les expériences 2 et 3, le cas échéant, si l'on rencontre des problèmes de solubilité ou de cytotoxicité ou si l'activité de la substance chimique semble se situer à l'extrémité de l'intervalle des concentrations testées.

PROCÉDURE DE CULTURE

Lignée de cellules

14. Les cellules NCI-H295R peuvent être obtenues commercialement auprès de l'ATCC (American Type Culture Collections), après signature d'un contrat de transfert de matériel ([1]).

Introduction

15. Étant donné que la capacité de production d'E2 des cellules évolue à mesure que leur âge/le nombre de passages en culture (repiquages) augmente (2), il convient de cultiver les cellules suivant un protocole spécifique avant de les utiliser, et de noter le nombre de passages à partir de la décongélation des cellules ainsi que le numéro du passage auquel les cellules ont été congelées et stockées dans l'azote liquide. Le premier chiffre indique le numéro de passage présent et le second, le numéro du passage auquel les cellules ont été congelées et stockées. Par exemple, des cellules qui ont été congelées après le passage n° 5, et décongelées puis séparées trois fois (4 passages en comptant les cellules juste décongelées comme le passage n° 1) après avoir été remises en culture ont le numéro de passage 4.5. On trouvera à l'appendice I du rapport de validation un exemple de système de numérotation (4).

16. On utilise un milieu-mère comme base pour le milieu supplémenté et le milieu de congélation. Le milieu supplémenté est une composante nécessaire pour cultiver les cellules. Le milieu de congélation est spécifiquement conçu pour permettre une congélation des cellules sans impact pour un stockage de longue durée. Avant utilisation, le Nu-Serum [ou un sérum comparable ayant les mêmes propriétés et dont il a été démontré qu'il produit des données satisfaisant aux exigences de performance de l'essai et au contrôle de qualité (CQ)], qui est un constituant des milieux supplémentés, est analysé pour les concentrations de fond de T et d'E2. La préparation de ces solutions est décrite à l'appendice II du rapport de validation (4).

([1]) ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, États-Unis (http://www.lgcstandards-atcc.org/).

▼M5

17. Après le lancement d'une culture de cellules H295R à partir d'un lot ATCC d'origine, les cellules sont cultivées pour 5 passages (c'est-à-dire qu'elles sont séparées 4 fois). Les cellules du passage 5 sont alors congelées dans l'azote liquide pour stockage. Avant de congeler les cellules, on teste un échantillon des cellules du passage 4 précédent dans une plaque CQ (voir les paragraphes 36 et 37) pour vérifier si la production basale d'hormones et la réponse aux produits témoins positifs satisfont aux critères de CQ de l'essai énoncés dans le tableau 5.

18. Les cellules H295R sont cultivées, congelées et stockées dans l'azote liquide pour qu'il y ait toujours des cellules d'âge ou de passage approprié disponibles pour la culture et l'utilisation. Après la mise en culture d'un lot de cellules nouveau ([1]) ou congelé ([2]), le nombre maximal de passages acceptable pour l'essai H295R ne dépasse pas 10. Par exemple, pour les cultures de cellules à partir d'un lot congelé au passage 5, les numéros de passage acceptables iraient de 4.5 à 10.5 compris. Pour la préparation des cellules à partir de ces lots congelés, la procédure décrite au paragraphe 19 s'applique. Ces cellules sont cultivées pendant au moins quatre (4) passages supplémentaires (passage 4.5) avant d'être utilisées dans le test.

Préparation des cellules à partir du stock congelé

19. La procédure de préparation des cellules à partir du stock congelé est utilisée lorsqu'un nouveau lot de cellules est retiré de l'azote liquide pour être cultivé et testé. L'appendice III du rapport de validation (4) décrit cette procédure en détail. Les cellules sont retirées de l'azote liquide, rapidement décongelées, placées dans un milieu supplémenté dans un tube à centrifuger, centrifugées à température ambiante, remises en suspension dans le milieu supplémenté et transférées dans un flacon de culture. Le milieu est changé le jour suivant. Les cellules H295R sont cultivées dans un incubateur à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO2 et le milieu est renouvelé 2 ou 3 fois par semaine. Quand les cellules ont atteint environ 85 à 90 % de confluence, il faut les séparer. Cette séparation est nécessaire pour assurer la santé et la croissance des cellules, et pour les préserver en vue de la réalisation d'essais biologiques. Les cellules sont rincées 3 fois à la solution saline tampon phosphate (PBS, sans Ca^{2+} ni Mg^{2+}) et libérées du flacon de culture par l'ajout d'une enzyme de décollement appropriée, par exemple la trypsine, dans la PBS (sans Ca^{2+} ni Mg^{2+}). Dès que les cellules se décollent du flacon de culture, il faut stopper l'action de l'enzyme en ajoutant le milieu supplémenté dans une proportion de 3 fois le volume utilisé pour le traitement par l'enzyme. On place les cellules dans un tube de centrifugation, on les centrifuge à température ambiante, on enlève le surnageant et on resuspend le culot de cellules dans le milieu supplémenté. On met la quantité appropriée de solution de cellules dans le nouveau flacon de culture. La quantité de solution de cellules est ajustée de telle sorte que les cellules soient confluentes dans les 5 à 7 jours. Le ratio de sous-culture recommandé est entre 1:3 et 1:4. La plaque est soigneusement étiquetée. Les cellules sont alors prêtes à être utilisées dans l'essai et les cellules en excédent sont congelées dans l'azote liquide comme décrit dans le paragraphe 20.

([1]) Un «lot nouveau» est un lot de cellules juste reçu de l'ATCC.

([2]) Un «lot congelé» correspond à des cellules qui ont été auparavant cultivées puis congelées dans un laboratoire autre que l'ATCC.

▼M5

Congélation des cellules H295R (préparation des cellules pour le stockage dans l'azote liquide)

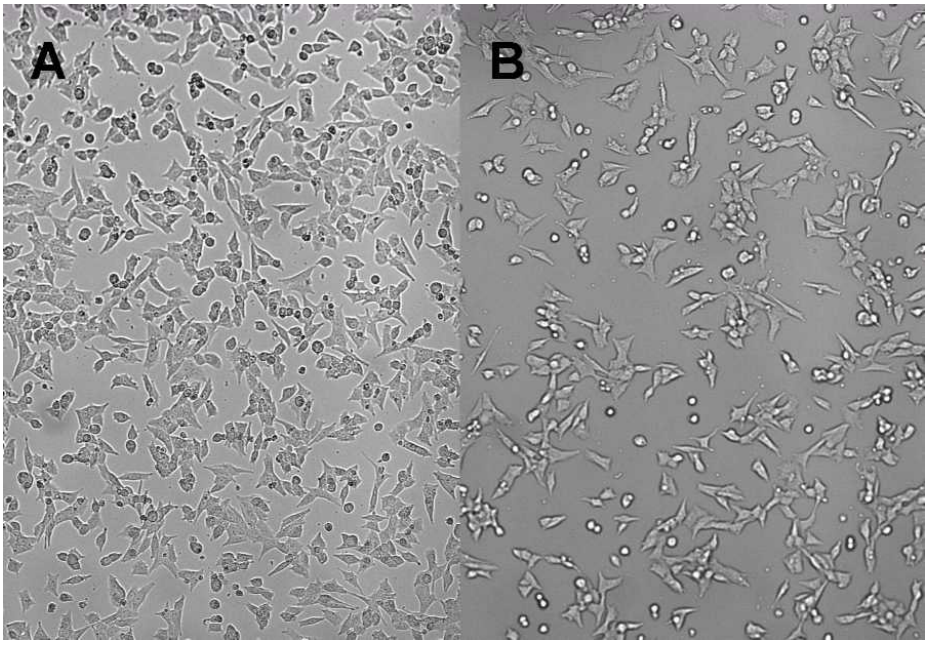
20. Pour préparer les cellules H295R à la congélation, on suit la procédure décrite ci-dessus pour la séparation des cellules jusqu'à l'étape où l'on resuspend le culot de cellules formé au fond du tube de centrifugation. Ici, on resuspend le culot de cellules dans le milieu de congélation. On transfère la solution dans un flacon cryogénique, on l'étiquette convenablement et on la congèle à – 80 °C pendant 24 heures, après quoi le flacon cryogénique est transféré vers l'azote liquide pour stockage. L'appendice III du rapport de validation (4) expose les détails de cette procédure.

Mise en plaque et préincubation des cellules pour les tests

21. Le nombre de plaques de 24 puits, préparées comme indiqué au paragraphe 19, qui sera nécessaire dépend du nombre de produits chimiques à tester et de la confluence des cellules dans les boîtes de culture. En règle générale, un récipient de culture (75 cm2) à 80-90 % de confluence fournira suffisamment de cellules pour 1 à 1,5 plaque (de 24 puits) à une densité cible de 200 000 à 300 000 cellules par ml de milieu conduisant à une confluence d'environ 50-60 % dans les puits à 24 heures (figure 2). C'est typiquement la densité de cellules optimale pour la production d'hormones dans l'essai. À de plus hautes densités, le profil de production de la T ainsi que de l'E2 est altéré. Avant de réaliser l'essai la première fois, il est recommandé de tester différentes densités entre 200 000 et 300 000 cellules par ml et de choisir pour les expériences ultérieures la densité conduisant à une confluence de 50-60 % dans les puits à 24 heures.

Figure 2

Photomicrographie de cellules H295R à une densité d'ensemencement de 50 % dans une plaque de culture à 24 puits à 24 heures, au bord (A) et au centre (B) d'un puits



22. On retire le milieu du flacon de culture à la pipette et on rince 3 fois les cellules à la PBS stérile (sans Ca^{2+} ni Mg^{2+}). On ajoute une solution d'enzyme (dans la PBS) pour décoller les cellules du flacon de culture. Quand le temps approprié pour le décollement des cellules s'est écoulé, il faut stopper l'action de l'enzyme en ajoutant le milieu supplémenté dans une proportion de 3 fois le volume utilisé pour le traitement par l'enzyme. On place les cellules dans un tube de centrifugation, on les centrifuge à température ambiante, on enlève le surnageant et on resuspend le culot de cellules dans le milieu supplémenté. On calcule la densité de cellules au moyen, par exemple, d'un hémocytomètre ou d'un compteur de cellules. La solution de cellules est diluée à la densité de mise en plaque souhaitée et soigneusement

▼M5

mélangée pour assurer une densité de cellules homogène. Les cellules sont mises en plaque avec 1 ml de solution de cellules par puits et les plaques et puits sont étiquetés. Les plaques ensemencées sont incubées à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO2 pendant 24 heures pour permettre aux cellules d'adhérer aux puits.

EXIGENCES DE CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

23. Il est essentiel que des volumes exacts de solutions et d'échantillons soient introduits dans les puits pendant le dosage parce que ces volumes déterminent les concentrations utilisées dans les calculs des résultats de l'essai.

24. Avant le début de la culture des cellules et tout test ultérieur, chaque laboratoire démontre la sensibilité de son système de mesure des hormones (paragraphes 29-31).

25. S'il est prévu d'utiliser des systèmes de mesure des hormones à base d'anticorps, il faut analyser les produits chimiques à tester en ce qui concerne leur potentiel d'interférence avec le système de mesure utilisé pour quantifier la T et l'E2, comme indiqué dans le paragraphe 32, avant de commencer les tests.

26. Le DMSO est le solvant recommandé pour cet essai. Si l'on utilise un autre solvant, il faut déterminer:

— la solubilité de la substance d'essai, de la forskoline et du prochloraz dans le solvant et

— la cytotoxicité en fonction de la concentration du solvant.

Il est recommandé que la concentration maximale admissible de solvant ne dépasse pas une dilution au dixième de la plus faible concentration cytotoxique du solvant.

27. Avant d'effectuer un test pour la première fois, le laboratoire réalise une expérience de qualification démontrant qu'il est capable d'établir et de maintenir les conditions de culture des cellules et les conditions expérimentales appropriées, requises pour tester les produits chimiques, comme il est décrit aux paragraphes 33 à 35.

28. Quand on commence des tests au moyen d'un lot de cellules nouveau, il faut exécuter un essai sur une plaque de CQ avant l'utilisation du lot afin d'évaluer la performance des cellules, comme il est décrit aux paragraphes 36 et 37.

Performance du système de mesure des hormones

Sensibilité, exactitude, précision de la méthode et réactivité croisée avec la matrice de l'échantillon

29. Chaque laboratoire peut utiliser un système de mesure des hormones de son choix pour l'analyse de la production de T et d'E2 par les cellules H295R dès lors qu'il satisfait aux critères de performance, y compris la limite de quantification (LdQ). En principe, elle est de 100 pg/ml pour la T et de 10 pg/ml pour l'E2, sur la base des niveaux de base d'hormones observés dans les études de validation. Toutefois, des niveaux moindres ou plus élevés peuvent être appropriés suivant les niveaux de base d'hormones atteints dans le laboratoire d'exécution. Avant de tester des plaques de CQ et des produits chimiques, le laboratoire démontre que le système qu'il utilisera peut mesurer les concentrations d'hormones dans le milieu supplémenté avec une exactitude et une précision suffisantes pour satisfaire aux critères de CQ spécifiés dans les tableaux 1 et 5 en analysant le milieu supplémenté

▼M5

dopé par un étalon d'hormone interne. Le milieu supplémenté est dopé par au moins 3 concentrations de chaque hormone (par exemple 100, 500 et 2 500 pg/ml de T; 10, 50 et 250 pg/ml d'E2; ou on peut utiliser, pour les plus basses concentrations de dopage par la T et l'E2, les concentrations les plus faibles possible sur la base des limites de détection du système de mesure des hormones choisi) et analysé. Il convient que les concentrations d'hormone mesurées des échantillons non extraits ne diffèrent pas de plus de 30 % des concentrations nominales, et que les variations entre les mesures répliquées du même échantillon ne dépassent pas 25 % (voir aussi le tableau 8 pour des critères de CQ additionnels). Si ces critères de CQ sont remplis, on admet que le système de mesure des hormones choisi est suffisamment exact et précis et ne comporte pas de réaction croisée avec les composants du milieu (matrice de l'échantillon) susceptible d'influer significativement sur le résultat de l'essai. Dans ce cas, aucune extraction d'échantillons n'est requise avant la mesure des hormones.

30. Dans le cas où les critères de CQ des tableaux 1 et 8 ne sont pas remplis, il peut y avoir un effet de matrice significatif et il faut effectuer une expérience en procédant à une extraction sur le milieu dopé. L'appendice II du rapport de validation (4) présente un exemple de procédure d'extraction. Les mesures des concentrations d'hormones dans les échantillons extraits sont faites en triple ([1]). Si l'on peut montrer qu'après extraction les composants du milieu n'interfèrent pas avec la méthode de détection des hormones conformément aux critères de CQ, toutes les expériences ultérieures sont conduites au moyen d'échantillons extraits. Si les critères de CQ ne sont pas satisfaits après extraction, le système de mesure des hormones utilisé n'est pas approprié aux besoins de l'essai de stéroïdogenèse H295R et il faut employer une autre méthode de détection des hormones.

Courbe standard

31. Les concentrations d'hormones des témoins solvant (TS) se situent dans la partie linéaire de la courbe standard. De préférence, les valeurs de TS sont proches du centre de la partie linéaire de manière qu'on puisse mesurer l'induction et l'inhibition de la synthèse des hormones. Les dilutions du milieu (ou des extraits) à mesurer sont choisies en conséquence. La relation linéaire est déterminée par une méthode statistique appropriée.

Test d'interférence des substances chimiques

32. S'il est prévu d'utiliser des essais à base d'anticorps comme les méthodes immunoenzymatiques (ELISA) ou radio-immunologiques (RIA) pour mesurer les hormones, il faut tester chaque substance chimique quant à son interférence potentielle avec le système de mesure des hormones qui doit être employé, avant de commencer à effectuer les essais de substances chimiques elles-mêmes [appendice III du rapport de validation (4)], parce que certaines de ces substances peuvent interférer avec ces tests (17). S'il se produit une interférence ≥ 20 % de la production basale d'hormones pour la T ou l'E2 telle que déterminée par l'analyse des hormones, le «Test d'interférence des substances chimiques avec la mesure des hormones» (décrit dans l'appendice III du rapport de validation (4), section 5.0) est effectué sur toutes les dilutions de solution mère des substances d'essai afin de

([1]) Remarque: si l'extraction est nécessaire, on effectue trois mesures répliquées pour chaque extrait. On n'extrait chaque échantillon qu'une seule fois.

▼M5

déterminer la dose seuil à partir de laquelle une interférence significative (≥ 20 %) se produit. Si l'interférence est inférieure à 30 %, on peut corriger les résultats en conséquence. Si l'interférence dépasse 30 %, les données sont invalides et, à ces concentrations, sont rejetées. Si une interférence significative d'une substance d'essai avec un système de mesure des hormones se produit à plusieurs concentrations non cytotoxiques, il faut utiliser un système de mesure des hormones différent. Pour éviter l'interférence de substances contaminantes, il est recommandé d'extraire les hormones du milieu au moyen d'un solvant approprié; on trouvera des méthodes possibles dans le rapport de validation (4).

Tableau 1

Critères de performance pour les systèmes de mesure des hormones

Paramètre	Critère
Sensibilité de la méthode de mesure	Limite de quantification (LdQ) T: 100 pg/ml; E2: 100pg/ml ([a])
Rendement d'extraction des hormones (seulement quand l'extraction est nécessaire)	Les taux de récupération moyens (sur la base de mesures en triple) pour les quantités d'hormone ajoutées ne montrent pas un écart supérieur à 30 % par rapport à la quantité ajoutée.
Interférence avec les produits chimiques (seulement systèmes à base d'anticorps)	Il convient qu'il n'y ait pas de réactivité croisée importante(≥ 30 % de la production basale d'hormone pour l'hormone considérée) avec aucune des hormones produites par les cellules ([b]) ([c])

([a]) *Note:* Les limites de la méthode de mesure reposent sur les valeurs de la production de base d'hormones présentées dans le tableau 5, et elles ont pour base les performances. Si une plus grande production basale d'hormones peut être atteinte, la limite peut être plus élevée.

([b]) Certains anticorps de la T et de l'E2 peuvent produire une réaction croisée respectivement avec l'androstènedione et l'œstrone, à un pourcentage plus élevé. Dans ce cas, il n'est pas possible de déterminer exactement les effets sur la 17ß-HSD. Toutefois, les données peuvent néanmoins fournir des informations utiles concernant les effets sur la production d'œstrogènes ou d'androgènes en général. Dans ce cas, les données sont exprimées en réponses androgènes/œstrogènes au lieu d'E2 et T.

([c]) C'est-à-dire: cholestérol, prégnénolone, progestérone, 11-désoxycorticostérone, corticostérone, aldostérone, 17α-prégnénolone, 17α-progestérone, désoxycortisol, cortisol, DHEA, androstènedione, œstrone.

Test d'aptitude du laboratoire

33. Avant de tester des substances chimiques inconnues, un laboratoire démontre, en effectuant le test d'aptitude, qu'il est capable d'établir et de maintenir les conditions de culture des cellules et les conditions d'expérience appropriées, requises pour conduire convenablement l'essai. Comme la réussite d'un essai est directement liée au personnel de laboratoire qui le conduit, ces procédures sont en partie répétées en cas de changement de personnel.

34. Ce test d'aptitude sera conduit dans les mêmes conditions que celles énoncées dans les paragraphes 38 à 40 en exposant les cellules à 7 concentrations croissantes d'inducteurs et d'inhibiteurs forts, modérés et faibles ainsi qu'à une substance chimique négative (voir le tableau 2). Précisément, comme l'indique le tableau 2, les produits chimiques à tester sont: la forskoline (n° CAS 66575-29-9), inducteur fort; le prochloraz (n° CAS 67747-09-5), inhibiteur fort; l'atrazine (n° CAS 1912-24-9), inducteur modéré; l'aminoglutéthimide (n° CAS 125-84-8), inhibiteur modéré; le bisphénol A

▼M5

(n° CAS 80-05-7), inducteur faible (production d'E2) et inhibiteur faible (production de T); la gonadotrophine chorionique humaine (HCG) (n° CAS 9002-61-3), substance négative. Des plaques distinctes sont testées pour tous les produits chimiques suivant le format présenté dans le tableau 6. Une plaque de CQ (tableau 4, paragraphes 36 et 37) est incluse à chaque exécution quotidienne pour les produits chimiques du test d'aptitude

Tableau 2

Substances chimiques du test d'aptitude et concentrations d'exposition

Substance chimique	Concentrations d'essai [µM]
Prochloraz	0 ([a]), 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10
Forskoline	0 ([a]), 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30
Atrazine	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Aminoglutéthimide	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Bisphénol A	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
HCG	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100

([a]) Témoin solvant (DMSO) (0), 1 µl DMSO/puits

L'exposition des H295R aux produits chimiques s'effectue dans des plaques à 24 puits durant le test d'aptitude du laboratoire. Le dosage est en µM pour toutes les doses des produits chimiques d'essai. Les doses sont administrées dans le DMSO à 0,1 % (v/v) par puits. Toutes les concentrations d'essai sont testées dans des puits en triple (tableau 6). On utilise des plaques distinctes pour chaque substance chimique. Une plaque de CQ est incluse à chaque exécution quotidienne.

35. Les analyses de viabilité des cellules et d'hormones sont conduites comme indiqué dans les paragraphes 42 à 46. La valeur seuil (concentration minimale avec effet observé, CMEO) et la décision de classification sont enregistrées et comparées aux valeurs du tableau 3. Les données sont considérées comme acceptables si elles satisfont aux conditions du tableau 3 pour la CMEO et la décision de classification.

Tableau 3

Valeurs seuils (CMEO) et décisions de classification pour les substances du test d'aptitude

	n° CAS	CMEO [µM]		Décision de classification	
		T	E2	T	E2
Prochloraz	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ ([a]) (Inhibition)	+ (Inhibition)
Forskoline	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (Induction)	+ (Induction)
Atrazine	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (Induction)	+ (Induction)
Aminoglutéthimide	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (Inhibition)	+ (Inhibition)

▼M5

	nº CAS	CMEO [µM]		Décision de classification	
		T	E2	T	E2
Bisphénol A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (Inhibition)	+ (Induction)
HCG	9002-61-3	n/a	n/a	Négatif	Négatif

(a) +, positif
n/a: non applicable étant donné qu'aucun changement ne doit avoir lieu après l'exposition aux concentrations non cytotoxiques du témoin négatif.

Plaque de contrôle de qualité

36. La plaque de contrôle de qualité (CQ) est utilisée pour vérifier la performance des cellules H295R dans des conditions de culture standard et pour établir une base de données historique pour les concentrations d'hormone dans les témoins solvant et les témoins positifs et négatifs, ainsi que d'autres mesures de CQ au cours du temps.

— Il faut évaluer la performance des cellules H295R au moyen d'une plaque de CQ pour chaque lot ATCC nouveau ou après utilisation, pour la première fois, d'un stock de cellules précédemment congelées sauf si le test d'aptitude du laboratoire (paragraphes 32-34) a été effectué avec ce lot de cellules.

— Une plaque de CQ fournit une évaluation complète des conditions de l'essai (par exemple viabilité des cellules, témoins solvant, témoins négatifs et positifs, ainsi que la variabilité intra- et interessai) quand on teste les produits chimiques et elle fait partie de chaque exécution de l'essai.

37. Le test de CQ s'effectue dans une plaque à 24 puits et suit les mêmes procédures d'incubation, de dosage, de viabilité des cellules/cytotoxicité, d'extraction des hormones et d'analyse des hormones décrites dans les paragraphes 38 à 46 pour l'essai des produits chimiques. La plaque de CQ contient des blancs, des témoins solvant et deux concentrations d'un inducteur connu (forskoline, 1; 10 µM) et d'un inhibiteur connu (prochloraz, 0,1; 1 µM) de la synthèse de l'E2 et de la T. En outre, on utilise du MeOH dans certains puits comme témoin positif pour l'essai de viabilité/cytotoxicité. Le tableau 4 présente une description détaillée de la disposition de la plaque. Les critères à satisfaire sur la plaque de CQ sont énoncés dans le tableau 5. Il convient que la production de base d'hormone minimale pour la T et l'E2 soit atteinte dans les témoins solvant et dans les blancs.

Tableau 4

Disposition de la plaque de contrôle de qualité pour tester la performance des cellules H295R non exposées et des cellules exposées à un inhibiteur connu (PRO = prochloraz) et à un inducteur connu (FOR = forskoline) de la production d'E2 et de T. Quand l'expérience d'exposition est terminée et après avoir enlevé le milieu, on ajoute une solution de méthanol à 70 % à tous les puits MeOH pour servir de témoin positif pour la cytotoxicité [voir l'essai de cytotoxicité dans l'appendice III du rapport de validation (4)]

	1	2	3	4	5	6
A	Blanc (a)	Blanc (a)	Blanc (a)	Blanc (a) (+ MeOH) (b)	Blanc (a) (+ MeOH) (b)	Blanc (a) (+ MeOH) (b)
B	DMSO (c) 1 µl	DMSO (c) 1 µl	DMSO (c) 1 µl	DMSO (c) 1 µl (+ MeOH) (b)	DMSO (c) 1 µl (+ MeOH) (b)	DMSO (c) 1 µl (+ MeOH) (b)

▼M5

	1	2	3	4	5	6
C	FOR 1 μM	FOR 1 μM	FOR 1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM
D	FOR 10 μM	FOR 10 μM	FOR 10 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM

([a]) Les cellules dans les puits blancs ne reçoivent que du milieu (pas de solvant).
([b]) Le méthanol (MeOH) est ajouté après que l'exposition est terminée et que le milieu a été retiré de ces puits.
([c]) Témoin solvant DMSO (1 μl/puits).

Tableau 5

Critères de performance pour la plaque de contrôle de qualité

	T	E2
Production de base d'hormone dans le témoin solvant (TS)	≥ 5 fois la LdQ	≥ 2,5 fois la LdQ
Induction (10 μM forskoline)	≥ 1,5 fois le TS	≥ 7,5 fois le TS
Inhibition (1 μM prochloraze)	≤ 0,5 fois le TS	≤ 0,5 fois le TS

PROCÉDURE D'EXPOSITION AUX SUBSTANCES CHIMIQUES

38. On retire les cellules préincubées de l'incubateur (paragraphe 21) et on les vérifie au microscope pour s'assurer qu'elles sont en bon état (attachement, morphologie) avant le dosage.

39. On place les cellules dans une enceinte de biosécurité, on enlève le milieu supplémenté et on le remplace par un nouveau milieu supplémenté (1 ml/puits). Le DMSO est le solvant préconisé pour la présente méthode d'essai. Au cas où il y aurait des raisons d'utiliser d'autres solvants, il faut en présenter la justification scientifique. On expose les cellules à la substance d'essai en ajoutant 1 μl de la solution mère appropriée dans le DMSO [voir l'appendice II du rapport de validation (4)] pour 1 ml de milieu supplémenté (volume du puits). Il en résulte une concentration finale de 0,1 % de DMSO dans les puits. Pour garantir un mélange adéquat, on préfère généralement que la solution mère appropriée de la substance d'essai dans le DMSO soit mélangée avec le milieu supplémenté pour obtenir la concentration finale souhaitée pour chaque dose, et que le mélange soit ajouté dans chaque puits immédiatement après avoir enlevé l'ancien milieu. Si l'on choisit cette option, il convient que la concentration de DMSO (0,1 %) reste la même pour tous les puits. Les puits contenant les deux plus fortes concentrations sont examinés visuellement pour détecter la formation de précipités ou d'une opacité indiquant une solubilité incomplète de la substance d'essai, au moyen d'un microscope stéréoscopique. Si l'on observe ce phénomène (opacité, formation de précipités), on examine aussi les puits contenant la concentration immédiatement inférieure (et ainsi de suite) et il faut exclure de la suite de l'évaluation et de l'analyse les concentrations non complètement dissoutes. On remet la plaque dans l'incubateur à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO2 pendant 48 heures. Le tableau 6 montre la disposition de la plaque pour les substances d'essai. Les désignations «stock 1» à «stock 7» montrent l'emplacement des doses croissantes de la substance d'essai.

▼M5

Tableau 6

Disposition des doses pour l'exposition des cellules H295R aux substances d'essai dans une plaque à 24 puits

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Stock 4	Stock 4	Stock 4
B	Stock 1	Stock1	Stock 1	Stock 5	Stock 5	Stock 5
C	Stock 2	Stock 2	Stock 2	Stock 6	Stock 6	Stock 6
D	Stock 3	Stock 3	Stock 3	Stock 7	Stock 7	Stock 7

40. Après 48 heures on retire les plaques d'exposition de l'incubateur et on examine tous les puits au microscope pour observer l'état des cellules (attachement, morphologie, degré de confluence) et les signes de cytotoxicité. On divise le milieu de chaque puits en deux parties égales (environ 490 µl chacune) et on les transfère dans deux fioles distinctes convenablement étiquetées (c'est-à-dire qu'une aliquote fournit un échantillon de réserve pour chaque puits). Pour éviter que les cellules ne sèchent, on retire le milieu, un rang ou une colonne à la fois, et on le remplace par le milieu de l'essai de viabilité des cellules/cytotoxicité. Si l'on ne mesure pas immédiatement la viabilité des cellules/cytotoxicité, on ajoute à chaque puits 200 µl de PBS avec Ca^{2+} et Mg^{2+}. On congèle les milieux à – 80 °C jusqu'aux opérations ultérieures d'analyse des concentrations d'hormone (voir les paragraphes 44-46). La T et l'E2 dans un milieu gardé à – 80 °C sont généralement stables pendant au moins 3 mois, mais il convient que la stabilité des hormones durant le stockage soit documentée dans chaque laboratoire.

41. Immédiatement après avoir enlevé le milieu, on détermine la viabilité des cellules/cytotoxicité pour chaque plaque d'exposition.

Détermination de la viabilité des cellules

42. On peut utiliser un essai de viabilité des cellules/cytotoxicité de son choix pour déterminer l'impact potentiel de la substance d'essai sur la viabilité des cellules. Cet essai doit être capable de fournir une mesure exacte du pourcentage de cellules viables présentes dans un puits, ou il convient de démontrer qu'il est directement comparable à/au (une fonction linéaire du) Live/Dead® Assay [voir l'appendice III du rapport de validation (4)]. Le test MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5- diphényl tétrazolium] est un autre essai dont on a montré qu'il fonctionne bien également (18). L'évaluation de la viabilité des cellules au moyen des méthodes précitées est une mesure relative qui ne présente pas nécessairement une relation linéaire avec le nombre absolu de cellules dans un puits. En conséquence, l'analyste effectue parallèlement une évaluation visuelle subjective de chaque puits, et des photos numériques des TS et des deux concentrations non cytotoxiques les plus élevées sont prises et archivées de manière à permettre, si nécessaire, une évaluation ultérieure de la densité exacte des cellules. S'il ressort de l'inspection visuelle ou de l'essai de viabilité/cytotoxicité qu'il semble y avoir une augmentation du nombre de cellules, il faut vérifier l'augmentation observée. Si l'augmentation est confirmée, ce point est consigné dans le rapport d'essai. La viabilité des cellules s'exprime par rapport à la réponse moyenne dans les TS, considérée correspondre à 100 % de cellules viables, et est calculée comme il convient selon l'essai de viabilité/toxicité cellulaire utilisé. Pour le test MTT, la formule suivante peut être utilisée:

▼M5

% de cellules viables = (réponse dans le puits – réponse moyenne dans les puits traités au MeOH [= 100 % de cellules mortes]) ÷ (réponse moyenne dans les puits TS – réponse moyenne dans les puits traités au MeOH [= 100 % de cellules mortes])

43. Les puits ayant une viabilité inférieure à 80 %, par rapport à la viabilité moyenne dans les TS (= 100 % de viabilité), ne sont pas inclus dans l'analyse finale des données. L'inhibition de la stéroïdogenèse qui a lieu en présence de presque 20 % de cytotoxicité nécessite un examen attentif pour s'assurer que la cytotoxicité n'en est pas la cause.

Analyse des hormones

44. Chaque laboratoire peut utiliser un système de mesure des hormones de son choix pour l'analyse de la T et de l'E2. On peut utiliser les aliquotes de réserve du milieu provenant de chaque groupe de traitement pour préparer des dilutions amenant la concentration dans la partie linéaire de la courbe standard. Comme indiqué au paragraphe 29, chaque laboratoire démontre la conformité de son système de mesure des hormones (par exemple ELISA, RIA, CPL-SM, CPL-SM/SM) aux critères de CQ en analysant le milieu supplémenté dopé par un étalon d'hormone interne avant d'effectuer des essais de CQ ou de tester des produits chimiques. Pour s'assurer que les composants du système de test n'interfèrent pas avec la mesure des hormones, il peut être nécessaire d'extraire les hormones des milieux avant de les mesurer (voir le paragraphe 30 pour les conditions dans lesquelles une extraction est ou non requise). Il est recommandé d'effectuer l'extraction suivant les procédures de l'appendice III du rapport de validation (4).

45. Si l'on utilise une trousse de test commerciale pour mesurer la production d'hormones, l'analyse des hormones est conduite comme spécifié dans les manuels fournis par le fabricant. La plupart des fabricants ont leur propre procédure de conduite des analyses d'hormones. Il faut ajuster les dilutions des échantillons de telle sorte que les concentrations d'hormone attendues pour les témoins solvant se situent au centre de la partie linéaire de la courbe standard de l'essai considéré [appendice III du rapport de validation (4)]. Les valeurs en dehors de la partie linéaire de la courbe standard sont rejetées.

46. Les concentrations finales d'hormone se calculent comme suit:

Exemple:

Extrait:	450 µl de milieu
Reconstitué dans:	250 µl de tampon de l'essai
Dilution dans l'essai:	1:10 (pour amener l'échantillon dans la partie linéaire de la courbe standard)
Concentration d'hormone dans l'essai:	150 pg/ml (déjà ramené à la concentration par ml d'échantillon testé)
Récupération:	89 %
Concentration finale d'hormone =	(concentration d'hormone [par ml] ÷ récupération) (facteur de dilution)
Concentration finale d'hormone =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

▼M5

Choix des concentrations de test

47. On procède à au moins deux exécutions indépendantes de l'essai. À moins que des informations antérieures, par exemple sur les limites de solubilité ou la cytotoxicité, fournissent une base pour le choix des concentrations d'essai, il est recommandé d'espacer les concentrations d'essai pour l'exécution initiale par des intervalles $\log_{10}$, avec une concentration maximale de 10^{-3} M. Si la substance chimique est soluble et non cytotoxique aux concentrations d'essai, et que la première exécution a été négative pour toutes les concentrations, cela est confirmé par une nouvelle exécution dans les mêmes conditions que la première (tableau 7). Si les résultats de la première exécution sont équivoques (c'est-à-dire si le facteur multiplicatif de changement par rapport au TS n'est statistiquement significatif que pour une seule concentration) ou positifs (c'est-à-dire si le facteur multiplicatif est statistiquement significatif pour au moins deux concentrations adjacentes), le test est répété comme l'indique le tableau 7, en affinant les concentrations d'essai choisies. Les concentrations d'essai dans les exécutions 2 et 3 (le cas échéant) sont ajustées sur la base des résultats de l'exécution initiale en affinant les concentrations qui ont généré un effet par un espacement 1/2-log (par exemple si l'exécution initiale avec 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1 000 μM a eu pour résultat une induction à 1 et 10 μM, les concentrations à tester à la deuxième exécution sont 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100 μM), à moins qu'il ne faille employer des concentrations plus faibles pour trouver une CMEO. Dans ce dernier cas, il faut utiliser à la deuxième exécution au moins cinq concentrations au-dessous de la concentration la plus faible testée à la première exécution, avec une échelle 1/2-log. Si la deuxième exécution ne confirme pas la première (c'est-à-dire qu'on n'observe pas de significativité statistique à la concentration précédemment testée positive ± 1 incrément de concentration), il faut exécuter une troisième expérience en revenant aux conditions initiales. Des résultats équivoques à la première exécution sont considérés comme négatifs si l'effet observé ne peut être confirmé dans aucune des deux exécutions suivantes. Les résultats équivoques sont considérés comme des réponses positives (effet) si la réponse peut être confirmée dans au moins une exécution supplémentaire à ± 1 incrément de concentration près (voir le paragraphe 55 pour la procédure d'interprétation des données).

Tableau 7

Matrice de décision pour les scénarios de résultats possibles

Exécution 1	Exécution 2		Exécution 3		Décision	
Scénario	Décision	Scénario	Décision	Scénario	Positive	Négative
Négatif	Confirmer ([a])	Négatif	Fin			X
Négatif	Confirmer ([a])	Positif	Affiner ([b])	Négatif		X
Équivoque ([c])	Affiner ([b])	Négatif	Confirmer ([a])	Négatif		X
Équivoque ([c])	Affiner ([b])	Négatif	Confirmer ([a])	Positif	X	
Équivoque ([c])	Affiner ([b])	Positif			X	
Positif	Affiner ([b])	Négatif	Confirmer ([a])	Positif	X	

▼M5

Exécution 1	Exécution 2		Exécution 3		Décision	
Scénario	Décision	Scénario	Décision	Scénario	Positive	Négative
Négatif	Confirmer ([a])	Positif	Affiner ([b])	Positif	X	
Positif	Affiner ([b])	Positif	Fin		X	

([a]) Confirmer l'exécution précédente avec le même plan d'expérience.
([b]) Réexécuter l'essai avec un espacement 1/2-log des concentrations (en encadrant la concentration pour laquelle on a observé un effet significatif dans l'expérience précédente).
([c]) Le facteur multiplicatif montre une différence statistiquement significative par rapport au TS pour une seule concentration.

Contrôle de qualité de la plaque de test

48. En plus des critères afférents à la plaque de CQ, il convient de satisfaire d'autres critères de qualité présentés dans le tableau 8 concernant les variations acceptables entre les puits répliqués, les expériences répliquées, la linéarité et la sensibilité des systèmes de mesure des hormones, la variabilité des mesures d'hormone répliquées d'un même échantillon, et le pourcentage de récupération des dopages d'hormone après extraction du milieu (le cas échéant; voir le paragraphe 30 concernant les conditions dans lesquelles une extraction est requise). Pour être prises en compte dans la suite de l'évaluation, il convient que les données se situent à l'intérieur des intervalles acceptables définis pour chaque paramètre. Si ce n'est pas le cas, il convient de noter dans la feuille de travail que les critères de CQ n'ont pas été remplis pour l'échantillon en question, et de réanalyser cet échantillon ou de le retirer de l'ensemble de données.

Tableau 8

Intervalles et/ou variation (%) acceptables pour les paramètres des plaques de test de l'essai H295R

(LdQ: limite de quantification du système de mesure des hormones. CV: coefficient de variation; TS: témoin solvant; DPM: désintégrations par minute)

	Comparaison	T	E2
Production de base d'hormone dans les TS	Facteur multiplicatif par rapport à la LdQ	≥ 5 fois	≥ 2,5 fois
Expériences d'exposition - CV intra-plaque pour les TS (puits répliqués)	Concentrations absolues	≤ 30 %	≤ 30 %
Expériences d'exposition CV intra-plaques pour les TS (expériences répliquées)	Facteur multiplicatif	≤ 30 %	≤ 30 %
Système de mesure des hormones - sensibilité	Facteur de diminution détectable par rapport aux TS	≥ 5 fois	≥ 2,5 fois
Système de mesure des hormones - CV des mesures répliquées pour les TS ([a])	Concentrations absolues	≤ 25 %	≤ 25 %
Extraction du milieu - Récupération de l'étalon ^{3}H interne (le cas échéant)	DPM	≥ 65 % du nominal	

([a]) Mesures répliquées d'un même échantillon

▼M5

ANALYSE DES DONNÉES ET COMPTE RENDU

Analyse des données

49. Pour évaluer l'augmentation ou la diminution relative de la production d'hormones chimiquement altérée, il faut normaliser les résultats sur la base de la valeur de TS moyenne de chaque plaque de test et exprimer les résultats sous la forme du changement par rapport aux TS de chaque plaque. Toutes les données sont exprimées sous la forme d'une moyenne ± 1 écart type.

50. Les données relatives aux hormones ne sont incluses dans l'analyse des données que pour les puits où la cytotoxicité était inférieure à 20 %. Les changements relatifs sont calculés comme suit:

Changement relatif = (concentration d'hormone dans le puits) ÷ (concentration d'hormone moyenne des puits à témoin solvant).

51. S'il ressort de l'inspection visuelle du puits ou de l'essai de viabilité/cytotoxicité décrit dans le paragraphe 42 qu'il semble y avoir une augmentation du nombre de cellules, il faut vérifier l'augmentation observée. Si l'augmentation est confirmée, ce point est consigné dans le rapport d'essai.

52. Avant de conduire des analyses statistiques, il faut évaluer les hypothèses de normalité et d'homogénéité des variances. La normalité est évaluée au moyen de graphiques de probabilités standard ou autre méthode statistique appropriée (par exemple test de Shapiro-Wilk). Si les données (changements relatifs) ne sont pas distribuées suivant une loi normale, il faut essayer de les transformer de manière à approcher une distribution normale. Si les données suivent ou approchent une distribution normale, il faut analyser les différences entre les groupes de concentration de la substance chimique et les TS au moyen d'un test paramétrique (par exemple test de Dunnett), la concentration étant la variable indépendante et la réponse (changement relatif), la variable dépendante. Si les données ne suivent pas une distribution normale, il faut utiliser un test non paramétrique approprié (par exemple test de Kruskal-Wallis, test de rangs multiunivoque de Steel). Les différences sont considérées comme significatives à $p \leq 0{,}05$. Les évaluations statistiques se font sur la base des valeurs moyennes des puits représentant des points de données répliqués indépendants. Il est à prévoir que, en raison du large espacement des doses dans la première exécution (échelle log10), il ne sera pas possible, dans de nombreux cas, de décrire une relation claire concentration-réponse où les deux doses les plus élevées soient dans la partie linéaire de la courbe en S. En conséquence, pour la première exécution ou tout autre ensemble de données dans ce cas (par exemple quand on ne peut estimer une efficacité maximale) on appliquera des statistiques à variable fixe de type I, comme décrit ci-dessus.

53. Si au moins deux points de données se situent dans la partie linéaire de la courbe et si l'on peut calculer les efficacités maximales — comme on le prévoit pour certaines des deuxièmes exécutions effectuées avec un espacement 1/2-log des concentrations d'exposition — un modèle probit, logit ou autre modèle de régression approprié est utilisé pour calculer les concentrations efficaces (par exemple CE50 et CE20).

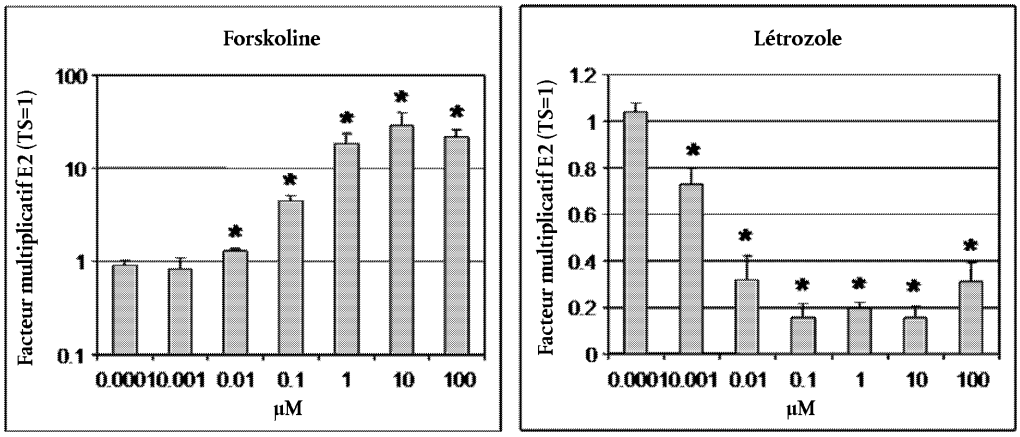
54. Les résultats sont fournis à la fois sous forme graphique (diagramme à barres représentant la moyenne ± 1 écart type) et tabulaire (CMEO/CSEO, direction de l'effet et ampleur maximale de la réponse dans la partie dose-réponse des données (voir l'exemple de la figure 3). L'appréciation des données n'est considérée comme valable que si elle repose sur au moins deux expériences exécutées indépendamment. Une expérience est considérée comme indépendante si elle a été exécutée à une date différente avec un nouvel ensemble de solutions et de témoins. L'intervalle des concentrations utilisé dans les exécutions 2 et 3 (si nécessaire) peut être adapté à l'appui des résultats de l'exécution 1, afin de mieux définir l'intervalle dose-réponse contenant la CMEO (voir le paragraphe 47).

▼M5

Figure 3

Exemple de la présentation et de l'évaluation des données obtenues durant la conduite de l'essai H295R, sous forme graphique et tabulaire

[Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives par rapport au témoin solvant ($p < 0,05$). CMEO: concentration minimale avec effet observé; changement maximal: ampleur maximale de la réponse observée à une concentration quelconque par rapport à la réponse moyenne des TS (= 1)]



Substance chimique	CMEO	Changement maximal
Forskoline	0,01	0,15 fois
Létrozole	0,001	29 fois

Procédure d'interprétation des données

55. Une substance d'essai est jugée positive si le rapport multiplicatif d'induction est statistiquement significatif ($p \leq 0,05$) par rapport au témoin solvant à deux concentrations adjacentes dans au moins deux exécutions de l'essai indépendantes (tableau 7). Une substance d'essai est jugée négative après deux exécutions négatives indépendantes ou après trois exécutions, dont deux négatives et une équivoque ou positive. Si les données générées dans trois expériences indépendantes ne correspondent à aucun critère de décision énoncé dans le tableau 7, les résultats expérimentaux ne sont pas interprétables. Les résultats à des concentrations qui dépassent les limites de solubilité ou à des concentrations cytotoxiques ne doivent pas être inclus dans l'interprétation des résultats.

Rapport d'essai

56. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Établissement réalisant l'essai

— Nom et adresse de l'établissement

— Directeur de l'étude et autres membres du personnel et leur responsabilité dans l'étude

— Dates de début et de fin de l'étude

▼**M5**

Substance d'essai, réactifs et témoins

— Identité (nom/n° CAS, le cas échéant), source, numéro de lot, pureté, fournisseur et caractérisation de la substance d'essai, des réactifs et des témoins

— Nature physique et propriétés physicochimiques pertinentes de la substance d'essai

— Conditions de stockage et méthode et fréquence de la préparation de la substance d'essai, des réactifs et des témoins

— Stabilité de la substance d'essai

Cellules

— Source et type des cellules

— Nombre de passages des cellules (identifiant de passage de cellules) des cellules utilisées dans l'essai

— Description des procédures d'entretien des cultures de cellules

Exigences préalables à l'essai (le cas échéant)

— Description et résultats du test d'interférence de la substance chimique avec la mesure des hormones

— Description et résultats des mesures de rendement d'extraction des hormones

— Courbes standard et d'étalonnage pour tous les essais d'analyse à conduire

— Limites de détection pour les essais d'analyse choisis

Conditions de l'essai

— Composition des milieux

— Concentration de la substance d'essai

— Densité des cellules (concentration des cellules estimée ou mesurée à 24 heures et 48 heures)

— Solubilité de la substance d'essai (limite de solubilité, si elle a été déterminée)

— Temps et conditions d'incubation

Résultats de l'essai

— Données brutes pour chaque puits pour les témoins et les substances d'essai — chaque mesure répliquée sous la forme des données originales fournies par l'instrument utilisé pour mesurer la production d'hormone (par exemple densité optique, unités de fluorescence, DPM, etc.)

— Validation de la normalité ou exposé de la transformation des données

— Réponses moyennes ± 1 écart type pour les puits mesurés

— Données de cytotoxicité (concentrations d'essai ayant provoqué la cytotoxicité)

— Confirmation de la conformité aux exigences de CQ

▼M5

— Changement relatif par rapport au témoin solvant, corrigé de la cytotoxicité

— Diagramme à barres montrant le changement relatif (facteur multiplicatif) à chaque concentration, l'écart type et la signification statistique comme décrit dans les paragraphes 49-54

Interprétation des données

— Application de la procédure d'interprétation des données aux résultats et discussion des constatations

Discussion

— Ressort-il de l'étude des indications quelconques concernant la possibilité que les données T/E2 puissent subir l'influence d'effets indirects sur la voie des glucocorticoïdes ou des minéralocorticoïdes?

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (2002), «Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens», à l'appendice 2 du chapitre B.54 de la présente annexe.

(2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R., et Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, Toxicol. Appl. Pharmacol., 217, 114-124.

(3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., et Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies, Env. Sci. Pollut. Res., 14, 23-30.

(4) OCDE (2010), Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production, série de l'OCDE sur les essais et évaluations, n° 132, ENV/JM/MONO(2010)31, OCDE, Paris, disponible à l'adresse suivante: http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html

(5) OCDE (2010), Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis, série de l'OCDE sur les essais et évaluations, n° 133, ENV/JM/MONO(2010)32, OCDE, Paris, disponible à l'adresse suivante: http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html

(6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis, disponible à l'adresse suivante: http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf

(7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S., et Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, Toxicol. Sci., 81, 78-89.

(8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G., et Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, Toxicol. Appl. Pharmacol., 182, 44-54.

(9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M., et Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, Environ. Health Perspect., 118:265-272.

▼**M5**

(10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P., et Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, Environ. Sci. Poll. Res., 17:1137-1148.

(11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A., et La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis, Cancer Res., 50, 5488-5496.

(12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W., et Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, Chemosphere, 80:578-584.

(13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S., et Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, Environ. Sci. Technol., 39:2777-2785.

(14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P., et Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activtity, and E2 and T production using the H295R cell line, Environ. Sci. Pol. Res., 17:1137-1148.

(15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R., et Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, J. Clin. Endocrinol. Metab., 77, 731-737.

(16) Chapitre B.55 de la présente annexe: «Bioessai de Hershberger sur le rat: essai de dépistage à court terme de propriétés (anti) androgéniques», ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, n° 441, OCDE, Paris, disponible à l'adresse suivante: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(17) Shapiro, R., et Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, J. Lab. Clin. Med., 2, 222-231.

(18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods, 65, 55-63.

(19) Brock, B.J., et Waterman, M.R. (1999), Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, Biochemistry, 38:1598-1606.

(20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J., et Goldfarb, P.S. (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, J. Appl. Toxicol., 26:484-492.

▼**M5**

Appendice

DÉFINITIONS

CMEO: concentration minimale avec effet observé; la plus faible concentration à laquelle la réponse de l'essai est statistiquement différente de celle du témoin solvant.

Confluence: couverture ou prolifération permise aux cellules sur ou dans le milieu de culture ou à l'intérieur.

Contrôle de qualité (CQ): les mesures nécessaires pour s'assurer de la validité des données.

CSEO: concentration sans effet observé; la plus forte concentration testée si l'essai ne donne pas de réponse positive.

CV: coefficient de variation; rapport de l'écart type d'une distribution à sa moyenne arithmétique.

CYP: mono-oxygénases du cytochrome P450; famille de gènes et les d'enzymes issues de ces gènes, qui participent à la catalyse de réactions biochimiques variées, et notamment à la synthèse et au métabolisme des hormones stéroïdes.

DPM: désintégrations par minute; nombre d'atomes dans une quantité donnée de matière radioactive dont la désintégration est détectée par minute.

E2: 17β-estradiol, œstrogène le plus important dans les systèmes mammifères.

Exécution indépendante: expérience indépendante caractérisée par un nouvel ensemble de solutions et de témoins.

H295R: cellules de carcinome surrénalien humain, qui ont les caractéristiques physiologiques de cellules surrénaliennes fœtales humaines zonalement indifférenciées et qui expriment toutes les enzymes de la voie de la stéroïdogenèse. On peut les obtenir de l'ATCC.

LdQ: limite de quantification; la plus faible quantité d'une substance chimique qu'on peut distinguer de l'absence de cette substance (valeur de blanc) dans une limite de confiance donnée. Pour les besoins de la présente méthode d'essai, la LdQ est généralement définie par le fabricant des systèmes d'essai, sauf autre spécification.

Milieu de congélation: utilisé pour congeler et stocker les cellules; il est constitué de milieu-mère stock auquel sont ajoutés du BD Nu-Serum et du diméthylsulfoxyde.

Milieu supplémenté: milieu-mère stock plus BD Nu-Serum et ITS+ Premix, voir l'appendice II du rapport de validation (4).

Milieu-mère: base de la préparation d'autres réactifs. Il est constitué d'un mélange 1:1 de DMEM (milieu d'Eagle modifié par Dulbecco) et de mélange nutritif F-12 de Ham (DMEM/F12) dans du tampon HEPES 15 mM sans rouge de phénol ni bicarbonate de soude. Le bicarbonate de soude est ajouté comme tampon, voir l'appendice II du rapport de validation (4).

Partie linéaire: partie de la courbe standard d'un système de mesure d'hormone où les résultats sont proportionnels à la concentration de l'analyte présent dans l'échantillon.

Passage (repiquage): nombre de fois où les cellules sont séparées à partir de la mise en culture de cellules d'un stock congelé. Le passage initial à partir du stock congelé est numéroté «passage 1». Les cellules séparées 1 fois sont numérotées «passage 2», etc.

PBS: solution saline tampon phosphate de Dulbecco.

▼**M5**

Plaque de contrôle de qualité: plaque à 24 puits contenant deux concentrations des témoins positifs et négatifs pour contrôler la performance d'un lot de cellules nouveau ou fournir les témoins positifs pour l'essai quand on teste les substances chimiques.

Plaque de test: plaque sur laquelle les cellules H295R sont exposées aux substances d'essai. Les plaques de test contiennent le témoin solvant et la substance d'essai à 7 niveaux de concentration en triple.

Stéroïdogenèse: voie de synthèse conduisant du cholestérol aux diverses hormones stéroïdes. Plusieurs intermédiaires de la voie de synthèse des stéroïdes comme la progestérone et la testostérone sont des hormones importantes en elles-mêmes, mais elles servent aussi de précurseurs à des hormones en aval.

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

T: testostérone; un des deux androgènes les plus importants dans les systèmes mammifères.

Trypsine 1X: solution diluée de l'enzyme trypsine, protéase à sérine pancréatique, utilisée pour décoller les cellules d'une plaque de culture, voir l'appendice III du rapport de validation (4).

▼M5

B.58. ESSAIS DE MUTATIONS GÉNÉTIQUES DES CELLULES SOMATIQUES ET GERMINALES DE RONGEURS TRANSGÉNIQUES

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice pour les essais de produits chimiques n° 488 de l'OCDE (2013). Les méthodes d'essai de l'Union européenne s'appliquent à toute une série d'essais de mutations in vitro permettant de détecter les mutations chromosomiques et/ou géniques. Certaines méthodes d'essai permettent de détecter des effets in vivo (à savoir les aberrations chromosomiques et la synthèse d'ADN non programmée) mais elles ne mesurent pas les mutations génétiques. Les essais de mutations chez les rongeurs transgéniques (RTG) répondent à ce besoin d'essais in vivo de mutations génétiques à la fois pratiques et exploitables à grande échelle.

2. Les essais de mutations chez les RTG ont fait l'objet d'un examen complet (24) (33). Pour ces essais, on utilise des rats et des souris transgéniques qui comportent de multiples copies de vecteurs navettes de plasmides ou de phages intégrés dans leurs chromosomes. Les transgènes contiennent des gènes rapporteurs pour la détection de différents types de mutations induites in vivo par les substances d'essai.

3. On compte les mutations qui se produisent chez un rongeur en retrouvant le transgène et en analysant le phénotype du gène rapporteur chez un hôte bactérien démuni du gène rapporteur. Les essais de mutations chez les RTG permettent de mesurer les mutations induites dans des gènes génétiquement neutres présents dans la quasi-totalité des tissus du rongeur. Ces essais permettent donc de surmonter un certain nombre d'obstacles qui entravent actuellement l'étude de la mutation génétique in vivo dans des gènes endogènes (quantité limitée de tissus appropriés pour l'analyse, sélection positive/négative par rapport aux mutations, par exemple).

4. Les données disponibles démontrent que les transgènes répondent aux mutagènes de manière similaire aux gènes endogènes, notamment en ce qui concerne la détection de substitutions d'une base par une autre, les décalages du cadre de lecture et les petites délétions et insertions (24).

5. Les ateliers internationaux sur les essais de génotoxicité (IWGT) ont approuvé la prise en compte des essais pour la détection in vivo des mutations génétiques chez les RTG et ont recommandé un protocole de mise en application de ces essais (15) (29). La présente méthode d'essai découle de ces recommandations. Le document référencé (16) donne une analyse plus détaillée des avantages induits par l'emploi de ce protocole.

6. On prévoit que, à l'avenir, il pourrait être possible de combiner des essais de mutations chez les RTG avec une étude de toxicité à doses répétées (chapitre B.7 de la présente annexe). Cependant, il est préalablement nécessaire d'obtenir des données afin de s'assurer que la sensibilité des essais de mutations chez les RTG n'est pas affectée par la réduction de la durée entre la fin de la période d'administration et le moment de l'échantillonnage. Cette durée est de 1 jour dans les essais de toxicité à doses répétées, alors qu'elle est de 3 jours dans les essais de mutations chez les RTG. Des données sont aussi requises pour s'assurer que la performance de l'étude de toxicité à doses répétées n'est pas affectée par l'utilisation d'une souche transgénique à la place de souches de rongeurs traditionnelles. Quand ces données seront disponibles, la présente méthode d'essai sera actualisée.

7. La définition des principaux termes figure dans l'appendice.

▼**M5**

CONSIDÉRATIONS INITIALES

8. Les essais de mutations chez les RTG pour lesquels il existe un nombre de données suffisant pour permettre de donner un avis favorable à leur utilisation dans le cadre de la présente méthode d'essai sont les suivants: souris bactériophage lacZ (Muta™Mouse); souris plasmide lacZ; souris et rat gpt delta (gpt et Spi–); souris et rat lacI (Big Blue®), mis en œuvre dans des conditions normales. De plus, l'essai de sélection positive cII peut être utilisé pour évaluer les mutations dans les modèles Big Blue® et Muta™-Mouse. Dans les modèles de RTG, le paramètre utilisé pour évaluer la mutagenèse est normalement la fréquence des mutants; toutefois, une analyse moléculaire des mutations peut, si nécessaire, fournir des informations supplémentaires (voir paragraphe 24).

9. Ces essais de mutations génétiques in vivo chez les rongeurs sont particulièrement pertinents pour évaluer le risque mutagène dans la mesure où les réponses qu'ils apportent dépendent du métabolisme in vivo, de la pharmacocinétique, des processus de réparation de l'ADN et de la synthèse d'ADN de translésion, bien que ces paramètres varient selon les espèces, selon les tissus et selon les types de dommages subis par l'ADN. Un essai in vivo de mutations génétiques sert à analyser plus en détail un effet mutagène détecté par un système in vitro et à effectuer un suivi des résultats d'essais utilisant d'autres indicateurs in vivo (24). Outre le fait qu'elles soient mises en cause dans l'apparition de cancers, les mutations génétiques constituent un indicateur pertinent pour prédire les pathologies non cancéreuses des tissus somatiques dues à des facteurs mutagènes (12) (13) ainsi que les pathologies transmises par le biais des cellules germinales.

10. Si des éléments prouvent que la substance d'essai ou un métabolite pertinent n'atteindra aucun des tissus d'intérêt, il n'est pas opportun d'avoir recours à l'essai de mutations chez les RTG.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

11. Dans les essais décrits au paragraphe 8, le gène cible est d'origine bactérienne ou bactériophagique, et sa récupération à partir de l'ADN génomique du rongeur se fait par introduction du transgène dans un vecteur navette de bactériophages λ ou de plasmides. Cette procédure implique l'extraction de l'ADN génomique du tissu d'intérêt du rongeur, le traitement in vitro de l'ADN génomique (à savoir l'encapsidation des vecteurs λ ou la ligature et l'électroporation des plasmides pour retrouver le vecteur navette) et la détection ultérieure des mutations subies par les hôtes bactériens dans des conditions appropriées. Les essais emploient des transgènes neutres faciles à retrouver à partir de la plupart des tissus.

12. L'essai de base de mutations chez les RTG implique d'administrer une substance chimique au rongeur pendant un certain temps. Toute voie d'administration appropriée est autorisée, y compris l'implantation (essais de dispositifs médicaux, par exemple). La période totale de traitement d'un animal est appelée la période d'administration. L'administration est généralement suivie d'une période, antérieure au sacrifice, au cours de laquelle la substance d'essai n'est pas administrée et au cours de laquelle les lésions d'ADN non réparées se fixent sous forme de mutations stables. Dans la littérature, cette période est désignée sous diverses appellations telles que la période de manifestation, la période de fixation ou la période d'expression; la fin de cette période marque le moment de l'échantillonnage (15) (29). Après le sacrifice de l'animal, l'ADN génomique est isolé du (des) tissus(s) d'intérêt puis purifié.

▼M5

13. Les données relatives à un seul tissu par animal, issues d'encapsidations/de ligatures multiples sont généralement agrégées, et la fréquence des mutants est généralement évaluée par le biais d'un nombre total d'unités formant plage ou d'unités formant colonie compris entre 10^5 et 10^7. En cas de recours à des méthodes de sélection positive, le nombre total d'unités formant plage est déterminé à l'aide d'un ensemble séparé de plages non sélectives.

14. Les méthodes de sélection positive ont été développées pour qu'on puisse détecter plus facilement les mutations du gène gpt [souris et rat gpt delta, phénotype gpt^- (20) (22) (28)] et du gène lacZ [Muta™Mouse ou souris plasmide lacZ (3) (10) (11) (30)], tandis que les mutations du gène lacI chez les animaux Big Blue® sont détectées par le biais d'une méthode non sélective qui permet d'identifier les mutants en générant des plages de couleur (bleue). Les méthodes de sélection positive permettent également de détecter les mutations ponctuelles du gène cII du bactériophage λ utilisé comme vecteur navette [souris ou rat Big Blue®, Muta™Mouse (17)] et les délétions sur les gènes λ red et gam [sélection Spi– chez souris et rat gpt delta) (21) (22) (28)]. On obtient la fréquence des mutants en divisant le nombre de plages/plasmides contenant les mutations qui se produisent dans le transgène par le nombre total de plages/plasmides retrouvés dans un même échantillon d'ADN. Dans les études de mutations chez les RTG, la fréquence des mutants est le paramètre observé. De plus, une fréquence de mutation peut être déterminée sous forme de fraction de cellules portant des mutations indépendantes; ce calcul nécessite de corriger l'expansion clonale par séquençage des mutants retrouvés (24).

15. Les mutations notées dans les essais de mutations ponctuelles lacI, lacZ, cII et gpt consistent essentiellement en substitutions d'une base par une autre, en décalages du cadre de lecture et en petites insertions/délétions. La part relative de ces types de mutations dans les mutations spontanées est similaire à celle observée pour le gène endogène Hprt. On observe des délétions importantes uniquement avec les essais de sélection du gène Spi– et de plasmides du gène lacZ (24). Les mutations qui nous préoccupent sont les mutations in vivo chez la souris ou le rat. Les mutations in vitro et ex vivo, qui peuvent se produire lors de la récupération des phages/plasmides, de la réplication ou de la réparation sont relativement rares et peuvent, dans certains systèmes, être spécifiquement identifiées ou exclues par l'hôte bactérien ou le système de sélection positive.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparations

Sélection de l'espèce animale

16. On dispose actuellement de divers modèles de détection des mutations génétiques chez les souris transgéniques, et ces systèmes continuent d'être plus souvent utilisés que les modèles impliquant des rats transgéniques. Si le rat se révèle manifestement plus adapté que la souris pour l'étude (par exemple si l'on étudie le mécanisme de la cancérogenèse d'une tumeur constatée uniquement chez les rats, pour établir une corrélation avec une étude de toxicité chez les rats ou si l'on sait que le métabolisme des rats est plus représentatif du métabolisme humain), le recours à des modèles impliquant des rats transgéniques est envisagé.

Conditions d'encagement et d'alimentation

17. La température de la salle d'expérimentation animale est idéalement de 22 °C (± 3 °C). Si l'humidité relative est de 30 % au minimum et, de préférence, de 70 % au maximum, sauf pendant le nettoyage de la salle, l'objectif est de maintenir une humidité relative de 50-60 %. La lumière est artificielle, avec une séquence quotidienne de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité. Les aliments classiques pour animaux de laboratoire peuvent être utilisés et l'eau potable est fournie à satiété. Le choix des

▼M5

aliments peut être influencé par la nécessité d'assurer une bonne incorporation de la substance chimique dans la nourriture si l'administration se fait par cette voie. Les animaux sont mis en cage par petits groupes (de cinq au maximum) du même sexe si aucun comportement agressif n'est à craindre. Les animaux peuvent être encagés individuellement si cela est justifié sur le plan scientifique.

Préparation des animaux

18. De jeunes adultes en bonne santé et sexuellement matures (âgés de 8-12 semaines au début du traitement) sont répartis au hasard dans les groupes témoins et les groupes de traitement. Les animaux sont identifiés individuellement. Les animaux sont gardés dans leurs cages pendant au moins 5 jours avant le commencement de l'étude, de façon à les acclimater aux conditions du laboratoire. Les cages sont disposées de telle manière qu'il n'y ait pas d'effets dus à l'emplacement des cages. Au début de l'étude, il convient que la variation pondérale des animaux soit minimale et ne dépasse pas ± 20 % du poids moyen de chaque sexe.

Préparation des doses

19. Les substances d'essai solides sont dissoutes, mises en suspension dans des solvants ou véhicules appropriés ou incorporées dans les aliments ou dans l'eau de boisson avant d'être administrées aux animaux. Les substances d'essai liquides peuvent être administrées directement ou diluées avant d'être administrées. En cas d'exposition par inhalation, les substances d'essai peuvent être administrées sous forme de gaz, de vapeur ou d'aérosol solide ou liquide en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Il faut utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

Conditions expérimentales

Solvant/véhicule

20. Il convient que le solvant/véhicule n'ait pas d'effets toxiques aux volumes de dose administrés et ne soit pas suspecté de réaction chimique avec la substance d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels fait l'objet de justification par des données de référence faisant état de leur compatibilité. On recommande d'envisager d'abord l'utilisation d'un solvant/véhicule aqueux chaque fois que c'est possible.

Témoins positifs

21. Des animaux témoins positifs sont normalement inclus simultanément dans l'essai. Cependant, pour les laboratoires ayant fait preuve de leur compétence (voir paragraphe 23) et qui utilisent ces essais en routine, l'ADN d'animaux témoins positifs traités précédemment peut être pris en compte dans chaque étude pour confirmer la réussite de la méthode. Il convient que cet ADN issu d'expériences précédentes provienne de la même espèce et des mêmes tissus d'intérêt, et soit stocké dans de bonnes conditions (voir paragraphe 36). Quand des témoins positifs sont inclus simultanément dans l'essai, il n'est pas nécessaire de les administrer par la même voie que celle de la substance d'essai; toutefois, il convient d'avoir la certitude que les témoins positifs induisent des mutations dans un ou plusieurs tissus d'intérêt pour la substance d'essai. Les doses des substances testées utilisées comme témoins positifs sont sélectionnées de manière à produire des effets faibles ou modérés qui permettent d'évaluer de manière critique les performances et la sensibilité de l'essai. Des exemples de substances utilisées comme témoins positifs et de certains de leurs tissus cibles figurent dans le tableau 1.

▼M5

Tableau 1

Exemples de substances utilisées comme témoins positifs et de certains de leurs tissus cibles

Substance servant de témoin positif et no CAS	Dénomination Einecs et no Einecs	Caractéristiques	Tissu cible de la mutation	
			Rat	Souris
N-nitroso-N-éthylurée [no CAS 759-73-9]	N-éthyl-N-nitrosurée [212-072-2]	Mutagène à action directe	Foie, poumons	Moelle osseuse, côlon, épithélium du côlon, intestins, foie, poumons, rate, rein, cellules de granulosa entourant l'ovocyte, cellules germinales mâles
Carbamate d'éthyle (uréthane) [no CAS 51-79-6]	Uréthane [200-123-1]	Mutagène, nécessite d'être métabolisé mais ne produit que des effets faibles		Moelle osseuse, secteur gastrique antérieur, intestin grêle, foie, poumons, rate
Toluène-2,4-diamine [no CAS 95-80-7]	4-méthyl-m-phénylènediamine [202-453-1]	Mutagène, nécessite d'être métabolisé, positif également dans l'essai Spi–	Foie	Foie
Benzo[a]pyrène [no CAS 50-32-8]	Benzo[def]chrysène [200-028-5]	Mutagène, nécessite d'être métabolisé	Foie, épiploon	Moelle osseuse, glandes mammaires, côlon, secteur gastrique antérieur, estomac glandulaire, cœur, foie, poumons, cellules germinales mâles

Témoins négatifs

22. Les témoins négatifs, traités seulement avec le solvant ou avec le véhicule, et sinon traités de manière identique aux groupes témoins, sont inclus à chaque moment d'échantillonnage. En l'absence de données significatives observées ou publiées montrant que le solvant/véhicule choisi n'induit pas d'effets délétères ou mutagènes, des témoins non traités sont également inclus à chaque moment d'échantillonnage afin d'établir l'acceptabilité du témoin contenant le véhicule.

Vérification des compétences du laboratoire

23. La compétence à mener ces essais est établie sur la base d'informations démontrant l'aptitude à reproduire les résultats escomptés à partir des données publiées (24) concernant: 1) les fréquences de mutants avec les substances des contrôles positifs (réponses faibles comprises) telles que celles énumérées dans le tableau 1, les non mutagènes et les témoins contenant le véhicule et 2) la récupération des transgènes de l'ADN génomique (efficacité de l'encapsidation, par exemple).

Séquençage des mutants

24. Pour les applications réglementaires, le séquençage de l'ADN des mutants n'est pas obligatoire, notamment en cas de résultat nettement positif ou négatif. Néanmoins, les données de séquençage peuvent être utiles si l'on observe de grandes variations entre les individus. Dans ces cas-là, le séquençage peut servir à exclure l'hypothèse de jackpots ou de clonages en permettant d'identifier la proportion de mutants uniques dans un tissu

▼M5

particulier. Le séquençage de 10 mutants environ par tissu et par animal suffit à déterminer si les mutants clonaux contribuent à la fréquence des mutants; séquencer jusqu'à 25 mutants peut se révéler nécessaire pour corriger mathématiquement les aspects de clonalité dans la fréquence des mutants. Le séquençage des mutants peut également être envisagé si l'on constate que la fréquence des mutants est en légère augmentation (la fréquence est alors légèrement supérieure aux valeurs des témoins non traités). Des différences en matière de spectre de mutants entre les colonies de mutants des animaux traités et des animaux non traités peuvent appuyer l'hypothèse d'un effet mutagène (29). De plus, les spectres de mutation peuvent servir à développer des hypothèses mécanistiques. Si le séquençage fait partie du protocole d'essai, la conception de l'essai fait l'objet d'une attention particulière, notamment en ce qui concerne le nombre de mutants séquencés par échantillon pour obtenir l'efficacité adéquate selon le modèle statistique utilisé (voir paragraphe 43).

DÉROULEMENT DE L'ESSAI

Nombre et sexe des animaux

25. Un nombre suffisamment important d'animaux est prévu afin d'obtenir l'efficacité statistique nécessaire pour détecter une fréquence de mutants au moins multipliée par deux. Chaque groupe contient au moins 5 animaux; toutefois, si l'efficacité statistique est insuffisante, on utilise un plus grand nombre d'animaux, selon les besoins. On a normalement recours à des mâles. Dans certains cas, le recours exclusif à des femelles peut être justifié, par exemple si l'essai porte sur des médicaments qui concernent spécifiquement la femme dans l'espèce humaine, ou si l'étude porte spécifiquement sur le métabolisme féminin. En cas de différences significatives entre les sexes en matière de toxicité ou de métabolisme, on utilisera à la fois des mâles et des femelles.

Période d'administration

26. Sachant que les mutations s'accumulent au fil des traitements, un régime de doses répétées est nécessaire, à raison de traitements quotidiens pendant 28 jours. Cette démarche est généralement jugée acceptable à la fois pour produire une accumulation suffisante de mutations par des mutagènes faibles et pour fournir une durée d'exposition adéquate pour la détection des mutations dans les organes à prolifération lente. D'autres régimes de traitement peuvent être adaptés pour certaines évaluations, et il convient que ces autres calendriers de dosage soient scientifiquement justifiés dans le protocole. Les traitements ne sont pas plus courts que le temps nécessaire à l'induction complète de l'ensemble des enzymes impliquées dans les métabolismes mis en jeu, et les traitements de plus courte durée peuvent nécessiter le recours à des moments d'échantillonnage multiples, adaptés aux organes dont les taux de prolifération sont différents. Quel que soit le cas de figure, toutes les informations disponibles (par exemple celles sur la toxicité générale ou le métabolisme et la pharmacocinétique) sont exploitées lorsqu'il s'agit de justifier un protocole, en particulier lorsque ce dernier dévie des recommandations standard décrites précédemment. S'ils permettent certes d'accroître la sensibilité, les traitements de plus de 8 semaines sont expliqués clairement et justifiés, car des traitements de longue durée peuvent engendrer une augmentation apparente de la fréquence de mutants par expansion clonale (29).

Niveaux de doses

27. Les niveaux de doses sont déterminés à partir des résultats d'une étude préliminaire de détermination des concentrations mesurant la toxicité générale, menée selon la même voie d'exposition, ou à partir de résultats d'études de toxicité subaiguë existantes. Des animaux non transgéniques appartenant à la même souche de rongeur peuvent être utilisés pour déterminer ces ordres de grandeur. Dans l'essai principal, pour obtenir des informations sur la relation dose-réponse, une étude complète comporte un groupe témoin négatif (voir paragraphe 22) et au moins trois niveaux de

▼M5

doses espacés comme il se doit, sauf si la dose limite a été utilisée (voir paragraphe 28). La dose supérieure est la dose maximale tolérée (DMT). La DMT est définie comme la dose induisant des signes de toxicité tels que des niveaux de doses supérieurs à cette dose, dans les mêmes conditions d'administration, seraient susceptibles d'avoir des effets létaux. Les substances d'essai ayant une activité biologique spécifique à des niveaux de doses faibles et non toxiques (telles que les hormones et les mitogènes) et les substances d'essai dont les propriétés toxicocinétiques sont saturées peuvent être considérées comme des exceptions aux critères de détermination des doses et sont évaluées au cas par cas. Les niveaux de doses employés sont compris entre «toxicité maximale» et «faible toxicité» voire «absence de toxicité».

Essai limite

28. Si les essais préliminaires de détermination des concentrations ou les données disponibles issues de souches de rongeurs apparentées indiquent qu'un régime de traitement égal ou supérieur à la dose limite (voir ci-dessous) n'engendre pas d'effets toxiques observables, et si la génotoxicité n'est pas escomptée sur la base des données relatives aux substances structurellement apparentées, une étude complète utilisant trois niveaux de doses peut ne pas être considérée comme nécessaire. Pour une période d'administration de 28 jours (soit 28 traitements quotidiens), la dose limite est de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour. Pour les périodes d'administration d'une durée inférieure ou égale à 14 jours, la dose limite est de 2 000 mg/kg de poids corporel/jour (les calendriers de dosage autres que 28 traitements quotidiens font l'objet d'une justification scientifique dans le protocole; voir paragraphe 26).

Administration des doses

29. La substance d'essai est généralement administrée par gavage à l'aide d'une sonde gastrique ou d'une canule de tubage adaptée. En général, la voie d'exposition humaine anticipée est prise en compte lors de la conception d'un essai. Par conséquent, les autres voies d'exposition (eau de boisson, sous-cutanée, intraveineuse, topique, inhalation, trachéale, alimentaire ou implantation, par exemple) peuvent être acceptables si elles peuvent être justifiées. Les injections intrapéritonéales ne sont pas recommandées, car la cavité péritonéale n'est pas une voie d'exposition humaine physiologiquement pertinente. Le volume maximal de liquide qu'on peut administrer par gavage ou par injection en une seule prise dépend de la taille de l'animal d'essai. Ce volume n'excède pas 2 ml/100 g de poids corporel. Le recours à des volumes plus importants fait l'objet de justification. Sauf pour les substances d'essai irritantes ou corrosives, qui auront normalement des effets exacerbés à des concentrations plus élevées, il convient de réduire la variabilité du volume d'essai par ajustement de la concentration pour garantir un volume constant à tous les niveaux de doses.

Moment d'échantillonnage

Cellules somatiques

30. Le moment d'échantillonnage est une variable essentielle car elle dépend de la période nécessaire pour que les mutations se fixent. Cette période est différente selon les tissus et semble dépendre du temps de renouvellement de la population cellulaire, la moelle osseuse et les intestins répondant rapidement tandis que le foie répond beaucoup plus lentement. Une période de 28 jours de traitements consécutifs (tel qu'indiqué au paragraphe 26) et un échantillonnage 3 jours après le dernier traitement semblent un compromis acceptable pour l'évaluation des fréquences de mutants à la fois dans les tissus à prolifération rapide et dans ceux à prolifération lente, bien que la fréquence maximale de mutants puisse ne pas se manifester dans les tissus à prolifération lente dans ces conditions. Si les tissus à prolifération lente sont d'une importance cruciale, un moment d'échantillonnage 28 jours après la période d'administration de 28 jours peut se révéler mieux indiqué (16) (29). Dans ce cas-là, le moment d'échantillonnage 28 jours après remplace le moment d'échantillonnage 3 jours après et fait l'objet d'une justification scientifique.

▼**M5**

Cellules germinales

31. Les essais chez les RTG conviennent bien à l'étude de l'induction d'une mutation génétique chez les cellules germinales mâles (7) (8) (27), pour lesquelles la chronologie et la cinétique de la spermatogenèse ont été bien définies (27). Le nombre limité d'ovules disponibles pour l'analyse, même après une superovulation et le fait qu'il n'y ait pas de synthèse de l'ADN dans l'ovocyte empêchent de déterminer, via les essais transgéniques, si les cellules germinales femelles ont subi une mutation (31).

32. Le moment d'échantillonnage pour les cellules germinales mâles est choisi de telle sorte que la gamme de types de cellules exposées tout au long du cycle de développement des cellules germinales soit échantillonnée et que le stade ciblé dans le cadre de l'échantillonnage ait été suffisamment exposé. La progression des cellules germinales en développement du stade de cellules souches spermatogoniales au stade de sperme mature rejoignant le canal déférent/la queue de l'épididyme dure 49 jours environ chez la souris (36) et 70 jours environ chez le rat (34) (35). Le sperme collecté dans le canal déférent/la queue de l'épididyme après s'y être accumulé pendant une période d'exposition de 28 jours, suivie d'une période d'échantillonnage de 3 jours (7) (8), représente une population de cellules exposées durant approximativement la seconde moitié de la spermatogenèse, population composée de cellules méiotiques et postméiotiques mais pas de cellules spermatogoniales ni de cellules souches. Pour un bon échantillonnage des cellules du canal déférent/de la queue de l'épididyme qui étaient des cellules souches spermatogoniales pendant la période d'exposition, un moment d'échantillonnage supplémentaire à 7 semaines au minimum (souris) ou 10 semaines au minimum (rat) après la fin de traitement est nécessaire.

33. Les cellules expulsées des tubes séminifères au bout d'un régime de 28 jours + 3 jours sont composées d'une population mixte enrichie pour tous les stades des cellules germinales en développement (7) (8). L'échantillonnage de ces cellules pour la détection de mutations génétiques ne fournit pas une évaluation aussi précise des stades auxquels les mutations de cellules germinales sont induites que l'échantillonnage des spermatozoïdes du canal déférent/de la queue de l'épididyme (car toute une série de types de cellules germinales sont échantillonnés à partir des tubes et des cellules somatiques contaminent cette population cellulaire). Néanmoins, l'échantillonnage des cellules à partir des tubes séminifères allié à celui des spermatozoïdes collectés dans le canal déférent/la queue de l'épididyme au bout d'un régime de 28 jours + 3 jours d'échantillonnage permettrait de couvrir, dans une certaine mesure, les cellules exposées pendant la majorité des phases de développement des cellules germinales et serait utile pour la détection de certains des mutagènes agissant sur les cellules germinales.

Observations

34. Les animaux font l'objet d'un examen clinique général au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en prenant en considération la période où les effets prévus devraient être les plus marqués après l'administration. L'état de santé des animaux est consigné. Au moins deux fois par jour, l'ensemble des animaux fait l'objet d'un constat de morbidité et de mortalité. Chaque animal est pesé au moins une fois par semaine, et juste après avoir été sacrifié. La consommation alimentaire est mesurée au moins une fois par semaine. Si la substance d'essai est diluée dans de l'eau avant d'être administrée, la consommation d'eau est mesurée à chaque changement d'eau et au moins une fois par semaine. Les animaux montrant des signes non létaux de toxicité excessive sont euthanasiés avant la fin de l'essai (23).

▼M5

Collecte des tissus

35. Les arguments invoqués pour justifier la collecte des tissus sont clairement définis. Étant donné qu'il est possible d'étudier l'induction de mutations quel que soit le tissu, ou presque, les tissus à collecter sont choisis en fonction des raisons qui ont motivé la conduite de l'étude et des données existantes relatives à la mutagénicité, à la cancérogénicité ou à la toxicité de la substance d'essai soumise à l'étude. La voie d'administration [basée sur la (les) voie(s) d'exposition humaine potentielle(s)], la distribution tissulaire prévue et le mécanisme d'action possible sont des facteurs importants à prendre en considération. En l'absence de documentation générale, plusieurs tissus somatiques sont collectés, selon l'intérêt qu'ils représentent. Il s'agira de tissus à prolifération rapide, de tissus à prolifération lente et de tissus appartenant au site de contact. En outre, les spermatozoïdes du canal déférent/de la queue de l'épididyme et les cellules germinales en développement des tubes séminifères (tel que décrits aux paragraphes 32 et 33) sont collectés et stockés au cas où l'analyse ultérieure de la mutagénicité des cellules germinales serait nécessaire. Les organes sont pesés, et pour les organes plus gros, la même zone est collectée sur tous les animaux.

Stockage des tissus et de l'ADN

36. Les tissus (ou homogénats de tissus) sont stockés à une température inférieure ou égale à — 70 °C et utilisés pour l'isolement de l'ADN avant expiration d'un délai de 5 ans. L'ADN isolé, réfrigéré à une température de 4 °C dans un tampon approprié est idéalement utilisé pour l'analyse des mutations avant expiration d'un délai de 1 an.

Sélection des tissus pour l'analyse des mutants

37. Les tissus sont sélectionnés en fonction des critères suivants: 1) la voie d'administration ou le site de premier contact (estomac glandulaire en cas d'administration par voie orale, poumon en cas d'administration par inhalation ou peau en cas d'administration par voie topique, par exemple); 2) les paramètres pharmacocinétiques observés dans les études de toxicité générale; ils indiquent l'élimination ou la rétention par les tissus, l'accumulation dans les tissus, ou les organes cibles pour la toxicité. Si des études sont menées pour faire suite à des études de cancérogénicité, les tissus cibles pour la cancérogénicité sont pris en considération. La sélection des tissus à analyser doit optimiser la détection de produits chimiques qui sont des mutagènes in vitro à action directe, rapidement métabolisés, hautement réactifs ou faiblement absorbés, ou pour lesquels le tissu cible est déterminé par la voie d'administration (6).

38. En l'absence de documentation générale, et si l'on tient compte du site de contact en fonction de la voie d'administration, la mutagénicité du foie et d'au moins un tissu à division rapide (estomac glandulaire, moelle osseuse, par exemple) est évaluée. Dans la plupart des cas, ces exigences peuvent être respectées par des analyses de deux tissus soigneusement sélectionnés, mais, dans certains cas, trois tissus, voire plus, sont nécessaires. S'il y a des raisons d'être particulièrement préoccupé par des effets sur les cellules germinales, y compris en raison de réponses positives dans les cellules somatiques, les mutations dans les tissus de cellules germinales sont évaluées.

Méthodes de mesure

39. Des méthodes standard de laboratoire ou publiées conçues pour la détection des mutants sont à disposition des modèles transgéniques recommandés: bactériophage lambda et plasmide lacZ (30); souris lacI (2) (18); souris gpt delta (22); rat gpt delta (28); cII (17). Les modifications font l'objet d'une justification et sont accompagnées d'une documentation adéquate. Les données issues de multiples encapsidations peuvent être agrégées et utilisées pour atteindre un nombre de plages ou de colonies adéquat. Toutefois, le fait qu'un nombre important de réactions d'encapsidation soit nécessaire pour atteindre le nombre de plages approprié peut être un indicateur d'un ADN de faible qualité. Dans ces cas-là, la prudence s'impose, car les

▼M5

données peuvent être dépourvues de fiabilité. Le nombre optimal de plages ou de colonies par échantillon d'ADN dépend de la probabilité statistique de détecter des mutants en nombre suffisant à une fréquence de mutants spontanés donnée. En général, un minimum de 125 000 à 300 000 plages est nécessaire si la fréquence de mutants spontanés est de l'ordre de 3×10^{-5} (15). Pour l'essai lacI (Big Blue®), il importe de démontrer que la gamme complète de phénotypes mutants de la couleur peut être détectée par inclusion de témoins de la couleur appropriée simultanément à chaque plage. Les tissus et les échantillons (items) qui en découlent sont traités et analysés selon un schéma par bloc où les items du groupe témoin véhicule/solvant, le groupe témoin positif (s'il y en a) ou l'ADN du témoin positif (s'il y a lieu) et chaque groupe de traitement sont traités ensemble.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

40. Les résultats individuels pour chaque animal sont présentés sous forme de tableaux. L'unité expérimentale est l'animal. Le rapport comporte le nombre total d'unités formant plage ou d'unités formant colonie, le nombre de mutants et la fréquence des mutants pour chaque tissu de chaque animal. En cas de réactions d'encapsidation/de récupération multiples, le nombre de réactions par échantillon d'ADN est consigné dans le rapport. S'il convient de conserver les données relatives à chaque réaction individuelle, seul le nombre total d'unités formant plage ou d'unités formant colonie est consigné par écrit. Les données de toxicité et les signes cliniques tels que décrits dans le paragraphe 35 sont consignés dans le rapport. Les résultats du séquençage sont présentés pour chaque mutant analysé, et les calculs de la fréquence de mutation qui en résultent pour chaque animal et chaque tissu sont montrés.

Évaluation statistique et interprétation des résultats

41. Plusieurs critères, tels qu'une augmentation de la fréquence des mutants liée à la dose ou une nette augmentation de la fréquence des mutants dans un seul groupe traité par rapport au groupe témoin solvant/véhicule, permettent de déterminer un résultat positif. Au moins trois groupes de traitement sont analysés pour obtenir des données suffisantes pour l'analyse de la relation dose-réponse. Si la pertinence biologique des résultats est considérée comme prioritaire, des méthodes statistiques appropriées peuvent servir d'aide à l'évaluation des résultats d'essai (4) (14) (15) (25) (26). Les méthodes statistiques employées considèrent l'animal comme unité expérimentale.

42. Une substance d'essai dont les résultats ne remplissent pas les critères susmentionnés quel que soit le tissu est considérée comme non mutagène dans cet essai. Pour la pertinence biologique d'un résultat négatif, il convient que l'exposition du tissu soit confirmée.

43. Pour les analyses du séquençage de l'ADN, un certain nombre de méthodes statistiques aident à interpréter les résultats (1) (5) (9) (19).

44. Le fait d'examiner si les valeurs observées appartiennent ou non à l'ordre de grandeur traditionnel peut fournir des indications au moment de l'évaluation de la signification biologique de la réponse (32).

▼**M5**

Rapport d'essai

45. Le rapport d'essai devrait comporter les informations suivantes:

Substance chimique

— Données d'identification et n° CAS, s'il est connu

— Source, numéro de lot s'il est disponible

— État physique et pureté

— Propriétés physico-chimiques pertinentes pour la conduite de l'étude

— Stabilité de la substance d'essai, si elle est connue

Solvant/véhicule

— Justification du choix du véhicule

— Solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant ou véhicule, si elles sont connues

— Préparation des formulations pour administration par l'alimentation, par l'eau de boisson ou par inhalation

— Déterminations analytiques sur les formulations (stabilité, homogénéité, concentrations nominales, par exemple)

Animaux d'expérience

— Espèce/souche utilisée et justification du choix

— Nombre, âge et sexe des animaux

— Source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.

— Poids individuel des animaux au début de l'essai, y compris la gamme des poids, l'écart moyen et pondéré dans chaque groupe

Conditions expérimentales

— Données des témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule)

— Données de l'étude préliminaire de détermination des concentrations

— Justification du choix des doses employées

— Détails concernant la formulation de la substance d'essai

— Détails concernant l'administration de la substance d'essai

— Justification du choix de la voie d'administration

— Méthodes de mesure de la toxicité animale, y compris, si elles existent, analyses histopathologiques ou hématologiques et fréquence des observations animales et des mesures du poids corporel

— Méthodes permettant de vérifier que la substance d'essai a atteint le tissu cible ou la circulation sanguine en cas de résultats négatifs

▼**M5**

— Dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour) calculée en fonction de la concentration (ppm) de la substance d'essai contenue dans la nourriture ou l'eau de boisson, et de la consommation, s'il y a lieu

— Détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau

— Description détaillée des calendriers de traitement et d'échantillonnage et justification des choix

— Méthode d'euthanasie

— Procédures d'isolation et de préservation des tissus

— Méthodes d'isolation de l'ADN génomique des rongeurs, avec récupération du transgène de l'ADN génomique et transfert de l'ADN génomique vers un hôte bactérien

— Source et numéros de lot de toutes les cellules, matériels et de tous les réactifs (s'il y a lieu)

— Méthodes d'énumération des mutants

— Méthodes d'analyse moléculaire des mutants et utilisation comme correctifs pour la clonalité et/ou pour calculer les fréquences de mutation, s'il y a lieu

Résultats

— État général de l'animal avant et pendant la période d'essai, y compris signes de toxicité

— Poids corporels et poids des organes, après sacrifice

— Pour chaque tissu/animal, évaluation du nombre de mutants, du nombre de plages ou de colonies, fréquence des mutants

— Pour chaque groupe de tissus/animaux, nombre de réactions d'encapsidation par échantillon d'ADN, nombre total de mutants, fréquence moyenne des mutants, écart type

— Relation dose-réponse, si possible

— Pour chaque tissu/animal, nombre de mutants indépendants et fréquence moyenne de mutation si une analyse moléculaire des mutations a été menée

— Données sur les animaux témoins négatifs inclus simultanément dans l'essai et données antérieures sur ces témoins négatifs avec ordres de grandeur, moyennes et écarts types

— Données sur les animaux témoins positifs inclus simultanément dans l'essai (ou sur l'ADN d'animaux témoins positifs précédemment obtenus)

— Déterminations analytiques si elles existent (concentrations d'ADN utilisées dans l'encapsidation, données du séquençage ADN, par exemple)

— Analyses et méthodes statistiques employées

Discussion des résultats

Conclusion

▼**M5**

BIBLIOGRAPHIE

(1) Adams, W.T., et Skopek, T.R. (1987), 'Statistical Test for the Comparison of Samples from Mutational Spectra', J. Mol. Biol., 194:391-396.

(2) Bielas, J.H. (2002), 'A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement', Mutation Res., 518:107-112.

(3) Boerrigter, M.E., Dollé, M.E., Martus, H.-J., Gossen, J.A., et Vijg, J. (1995), 'Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying in vivo Mutations', Nature, 377(6550):657-659

(4) Carr, G.J., et Gorelick, N.J. (1995), 'Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice', Environ. Mol. Mutagen, 25(3):246-255.

(5) Carr, G.J., et Gorelick, N.J. (1996), 'Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency', Environ. Mol. Mutagen, 28:405-413.

(6) Dean, S.W., Brooks, T.M., Burlinson, B., Mirsalis, J., Myhr, B., Recio, L., et Thybaud, V. (1999), 'Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing in vivo for the Detection of Site-of-contact Mutagens', Mutagenesis, 14(1):141-151.

(7) Douglas, G.R., Jiao, J., Gingerich, J.D., Gossen, J.A., et Soper, L.M. (1995), 'Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of lacZ Transgenic Mice', Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7485-7489.

(8) Douglas, G.R., Gingerich, J.D., Soper, L.M., et Jiao, J. (1997), 'Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells', Mutation Res., 388(2-3):197-212.

(9) Dunson, D.B., et Tindall, K.R. (2000), 'Bayesian Analysis of Mutational Spectra', Genetics, 156:1411-1418.

(10) Gossen, J.A., de Leeuw, W.J., Tan, C.H., Zwarthoff, E.C., Berends, F., Lohman, P.H., Knook, D.L., et Vijg, J. (1989), 'Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations in vivo', Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86(20):7971-7975.

(11) Gossen, J.A., et Vijg, J. (1993), 'A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive E. coli Host', Biotechniques, 14(3):326, 330.

(12) Erikson, R.P. (2003), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer', Mutation Res., 543:125-136.

(13) Erikson, R.P. (2010), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update', Mutation Res., 705:96-106.

(14) Fung, K.Y., Douglas, G.R. et Krewski, D. (1998), 'Statistical Analysis of lacZ Mutant Frequency Data from Muta™Mouse Mutagenicity Assays', Mutagenesis, 13(3):249-255.

(15) Heddle, J.A., Dean, S., Nohmi, T., Boerrigter, M., Casciano, D., Douglas, G.R., Glickman, B.W., Gorelick, N.J., Mirsalis, J.C., Martus, H.-J, Skopek, T.R., Thybaud, V., Tindall, K.R. et Yajima, N. (2000), 'In vivo Transgenic Mutation Assays', Environ. Mol. Mutagen., 35:253-259.

(16) Heddle, J.A., Martus, H.-J., et Douglas, G.R. (2003), 'Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays', Environ. Mol. Mutagen., 41:1-6.

▼M5

(17) Jakubczak, J.L., Merlino, G., French, J.E., Muller, W.J., Paul, B., Adhya, S., et Garges, S. (1996), 'Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for in vivo Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target', Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93(17):9073-9078.

(18) Kohler, S.W., Provost, G.S., Kretz, P.L., Fieck, A., Sorge, J.A., et Short, J.M. (1990), 'The Use of Transgenic Mice for Short-term, in vivo Mutagenicity Testing', Genet. Anal. Tech. Appl., 7(8):212-218.

(19) Lewis P.D., Manshian, B., Routledge, M.N., Scott, G.B. et Burns, P.A. (2008), 'Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis', Carcinogenesis, 29(4):772-778.

(20) Nohmi, T., Katoh, M., Suzuki, H., Matsui, M., Yamada, M., Watanabe, M., Suzuki, M., Horiya, N., Ueda, O., Shibuya, T., Ikeda, H., et Sofuni, T. (1996), 'A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi- and 6-thioguanine Selections', Environ. Mol. Mutagen., 28(4):465-470.

(21) Nohmi, T., Suzuki, M., Masumura, K., Yamada, M., Matsui, K., Ueda, O., Suzuki, H., Katoh, M., Ikeda, H., et Sofuni, T. (1999), 'Spi– Selection: an Efficient Method to Detect γ-ray-induced Deletions in Transgenic Mice', Environ. Mol. Mutagen., 34(1):9-15.

(22) Nohmi, T., Suzuki, T., et Masumura, K.I. (2000), 'Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays', Mutation Res., 455(1-2):191-215.

(23) OCDE (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/M0N0(2000)7, OCDE, Paris.

(24) OCDE (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, No. 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OCDE, Paris.

(25) Piegorsch, W.W., Margolin, B.H., Shelby, M.D., Johnson, A., French, J.E., Tennant, R.W., et Tindall, K.R. (1995), 'Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay', Environ. Mol. Mutagen., 25(3):231-245.

(26) Piegorsch, W.W., Lockhart, A.C., Carr, G.J., Margolin, B.H., Brooks, T., Douglas, G.R., Liegibel, U.M., Suzuki, T., Thybaud, V., van Delft, J.H., et Gorelick, N.J. (1997), 'Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study', Mutation. Res., 388(2-3):249-289.

(27) Singer, T.M., Lambert, I.B., Williams, A., Douglas, G.R., et Yauk, C.L. (2006), 'Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays', Mutation. Res., 598:164-193.

(28) Toyoda-Hokaiwado, N., Inoue, T., Masumura, K., Hayashi, H., Kawamura, Y., Kurata, Y., Takamune, M., Yamada, M., Sanada, H., Umemura, T., Nishikawa, A., et Nohmi, T. (2010), 'Integration of in vivo Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: in vivo Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers', Toxicol. Sci., 114(1):71-78.

(29) Thybaud, V., Dean, S., Nohmi, T., de Boer, J., Douglas, G.R., Glickman, B.W., Gorelick, N.J., Heddle, J.A., Heflich, R.H., Lambert, I., Martus, H.-J., Mirsalis, J.C., Suzuki, T., et Yajima, N. (2003), 'In vivo Transgenic Mutation Assays', Mutation Res., 540:141-151.

(30) Vijg, J., et Douglas, G.R. (1996), 'Bacteriophage λ and Plasmid lacZ Transgenic Mice for studying Mutations in vivo', in Pfeifer, G. (ed), Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II, Plenum Press, New York, NY, USA, p. 391-410.

▼**M5**

(31) Yauk, C.L., Gingerich, J.D., Soper, L., MacMahon, A., Foster, W.G., et Douglas, G.R. (2005), 'A lacZ Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells', Mutation Res, 578(1-2):117-123.

(32) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J., et Thybaud, V. (2011), 'Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data', Mutation Res., doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.

(33) OCDE (2011), Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, No. 145, ENV/JM/MONO(2011)20, OCDE, Paris.

(34) Clermont, Y. (1972), 'Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonia! renewal', Physiol. Rev., 52:198-236.

(35) Robaire, B., Hinton, B.T., et Oregbin-Crist, M.-C. (2006), 'The Epididymis', in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., et Wassarman, P. M (eds), Physiology of Reproduction, Elsevier, Pays-Bas, p. 1071-1148.

(36) Russell, L.B. (2004), 'Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse', Genetica, 122:25-36.

▼M5

Appendice

DÉFINITIONS

Capside: structure protéinique qui entoure une particule virale.

Concatémère: longue biomolécule continue constituée de multiples copies identiques répétées en série.

Décalage du cadre de lecture: mutation génétique provoquée par des insertions ou des délétions de nucléotides dont le nombre n'est pas un multiple de trois dans la séquence d'ADN qui code une protéine ou un peptide.

Délétion: mutation induisant une perte d'une partie du génome allant d'un à plusieurs nucléotides (séquentiels).

Délétions importantes: délétions de l'ADN dont le nombre est supérieur à plusieurs kilobases (les essais de sélection du gène Spi– et de plasmides du gène lacZ permettent de les détecter efficacement).

Efficacité de l'encapsidation: efficacité avec laquelle les bactériophages encapsidés sont retrouvés dans la bactérie hôte.

Électroporation: envoi d'impulsions électriques qui améliorent la perméabilité membranaire des cellules.

Encapsidation: synthèse de particules phagiques infectieuses issues d'une préparation à base de capsides et de queues protéiques de phages et d'un concatémère de molécules d'ADN de phages. Technique fréquemment utilisée pour introduire l'ADN cloné et véhiculé par un vecteur lambda (séparé par des sites cos) à l'intérieur des particules lambda infectieuses.

Expansion clonale: production de nombreuses cellules à partir d'une seule cellule (mutante).

Gène endogène: gène qui prend sa source dans le génome.

Gène neutre: gène non soumis aux pressions de la sélection positive ou négative.

Gène rapporteur: gène dont le produit (gène mutant) est facilement détecté.

Insertion: ajout d'une ou de plusieurs paires de bases nucléotidiques dans une séquence d'ADN.

Jackpot: apparition d'un nombre important de mutants à la suite d'une expansion clonale à partir d'une seule mutation.

Ligature: formation d'une liaison covalente entre deux extrémités de molécules d'ADN par l'ADN ligase.

Mitogène: substance qui aide une cellule à entamer sa division cellulaire, provoquant ainsi la mitose (ou division cellulaire).

Moment d'échantillonnage: moment qui marque la fin de la période antérieure au sacrifice de l'animal, au cours de laquelle la substance d'essai n'est pas administrée et au cours de laquelle les lésions d'ADN non réparées se fixent sous forme de mutations stables.

Mutation ponctuelle: terme générique désignant une mutation qui affecte seulement une petite séquence d'ADN (petites insertions, délétions et substitutions d'une base par une autre).

Période d'administration: période totale au cours de laquelle un animal se voit administrer la substance d'essai.

Sélection positive: méthode permettant uniquement aux mutants de survivre.

Site cos: segment d'ADN simple brin possédant 12 nucléotides, présent aux deux extrémités du génome double brin du bactériophage lambda.

▼**M5**

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Substitution d'une paire de bases: type de mutation qui engendre le remplacement d'un nucléotide à une seule base par un autre nucléotide d'ADN.

Transgénique: qualifie un être vivant issu d'un organisme ou un organisme dont le génome a été modifié par l'introduction d'un ou de plusieurs gènes d'une autre espèce.

Unité formant colonie (UFC): unité utilisée pour dénombrer les bactéries viables.

Unité formant plage (UFP): unité utilisée pour dénombrer les bactériophages viables.

Variation extrabinomiale: variabilité des estimations répétées d'une proportion de population plus importante que ce qui pourrait être escompté si la population avait une distribution binomiale.

Vecteur navette: vecteur dont la structure lui permet de se propager dans deux espèces hôtes différentes; ainsi, l'ADN introduit dans un vecteur navette peut être testé ou manipulé dans deux types de cellules différents ou dans deux organismes différents.

▼M7

B.59. SENSIBILISATION CUTANÉE IN CHEMICO: ESSAI DE RÉACTIVITÉ PEPTIDIQUE DIRECT (DPRA)

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 442C (2015) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Un sensibilisant cutané est une substance qui provoque une réponse allergique suite à un contact avec la peau, selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU) (1) et du règlement (CE) n° 1272/2008 de l'Union européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (CLP) ([1]). La présente méthode d'essai décrit une procédure *in chemico*, à savoir l'essai de réactivité peptidique direct (*Direct Peptide Reactivity Assay*, DPRA), qui doit aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés, selon le SGH et le CLP.

Les principales phases du processus biologique de sensibilisation cutanée font l'objet d'un consensus général. Les connaissances dont on dispose sur les mécanismes chimiques et biologiques associés à la sensibilisation cutanée sont résumées sous la forme d'une voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables (AOP, *Adverse Outcome Pathway*) (2) allant de l'événement moléculaire initiateur jusqu'aux effets indésirables sur la santé que sont la dermatite de contact allergique chez l'homme ou l'hypersensibilité de contact chez les rongeurs, en passant par les étapes intermédiaires. Dans l'AOP relative à la sensibilisation cutanée, l'événement moléculaire initiateur est l'établissement d'une liaison covalente entre des substances chimiques électrophiles et les centres nucléophiles des protéines de la peau.

Traditionnellement, l'évaluation de la sensibilisation cutanée a fait appel à l'expérimentation animale. Les méthodes classiques — test de maximisation chez le cobaye (GPMT) de Magnusson et Kligman et test de Buehler, également chez le cobaye [méthode d'essai B.6 (3)]– portent sur les phases d'induction et d'élicitation de la sensibilisation cutanée. Un essai sur la souris, l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL) [méthode d'essai B.42 (4)], et ses deux variantes n'utilisant pas d'isotopes radioactifs, l'ELGL: DA [méthode d'essai B.50 (5)] et l'ELGL: BrdU-ELISA [méthode d'essai B.51 (6)], tous trois portant sur la réponse à l'induction exclusivement, se sont également imposés, car ils présentent l'avantage, par rapport aux tests sur le cobaye, de préserver davantage le bien-être animal et de fournir une mesure objective de la phase d'induction de la sensibilisation cutanée.

Plus récemment, des méthodes d'essai *in chemico* et *in vitro* de type mécanistique ont été considérées comme scientifiquement valides pour l'évaluation du danger de sensibilisation cutanée lié aux produits chimiques. Cependant des combinaisons de méthodes de substitution à l'expérimentation animale (méthodes *in silico*, *in chemico*, *in vitro*) seront nécessaires, dans le cadre des approches intégrées en matière d'essais et d'évaluation (IATA, *Integrated Approaches to Testing and Assessment*), pour qu'il soit possible de remplacer les essais sur l'animal actuellement pratiqués, compte tenu de la restriction de chacune de ces méthodes pour ce qui est de la couverture mécanistique de l'AOP (2) (7).

Le DPRA est proposé pour l'étude de l'événement moléculaire initiateur dans l'AOP sensibilisation cutanée, nommément la réactivité protéique, par quantification de la réactivité des produits chimiques testés vis-à-vis de modèles peptidiques de synthèse contenant soit de la lysine, soit de la cystéine (8). Les taux de déplétion de la cystéine et de la lysine sont ensuite utilisés pour classer les substances dans l'une des quatre classes de réactivité, afin d'aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés (9).

([1]) Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006.

▼M7

Le DPRA a fait l'objet d'une étude de validation du Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les méthodes de substitution à l'expérimentation animale (EURL ECVAM), suivie d'un examen indépendant par des pairs sous la conduite du Comité scientifique consultatif (ESAC) de ce laboratoire, qui a considéré le DPRA comme scientifiquement valide (10), dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA, pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés à des fins de classification et d'étiquetage des dangers. On trouvera dans la littérature des exemples d'utilisation de la méthode d'essai DPRA combinée à d'autres sources d'information (11) (12) (13) (14).

Les définitions sont données à l'appendice 1.

CONSIDÉRATIONS PRÉLIMINAIRES, APPLICABILITÉ ET LIMITES

La corrélation entre la réactivité aux protéines et le pouvoir de sensibilisation cutanée est bien établie (15) (16) (17). Cependant, étant donné que la liaison aux protéines n'est qu'un des événements clés de l'AOP sensibilisation cutanée, même s'il s'agit de l'événement moléculaire initiateur, les données relatives à la réactivité aux protéines obtenues par des méthodes expérimentales et non expérimentales ne sont généralement pas suffisantes à elles seules pour conclure à l'absence de pouvoir de sensibilisation cutanée des produits chimiques. Il convient donc de considérer les données issues de l'application de la présente méthode d'essai dans le contexte d'une approche intégrée de type IATA, en combinant ces données à d'autres informations complémentaires provenant par exemple d'essais *in vitro* portant sur d'autres phases de l'AOP sensibilisation cutanée, ainsi que de méthodes non expérimentales telles que la prévision à partir de données croisées (*read-across*) relatives à des produits chimiques similaires.

La présente méthode d'essai peut apporter une aide, en combinaison avec d'autres sources d'information complémentaires, à l'identification des sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH/CLP) et des non-sensibilisants, dans le cadre d'une approche intégrée (IATA). Cette méthode d'essai ne peut pas être utilisée seule, ni pour le classement des sensibilisants cutanés dans les sous-catégories 1A et 1B du SGH/CLP, ni pour prédire la puissance de sensibilisation dans le cadre d'évaluations de sécurité. Cependant, en fonction du cadre réglementaire applicable, un résultat positif peut être considéré comme suffisant à lui seul pour classer un produit chimique dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU/CLP.

La transférabilité de la méthode d'essai DPRA à des laboratoires expérimentés dans le domaine de la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) a été démontrée. Le niveau de reproductibilité attendu des prédictions faites par la méthode d'essai sont de l'ordre de 85 % intra-laboratoire et 80 % inter-laboratoires (10). Dans l'ensemble, les résultats issus de l'étude de validation (18) et des études publiées (19) montrent que la précision de la méthode DPRA pour distinguer les sensibilisants (catégorie 1 du SGH/CLP) des non-sensibilisants est de 80 % (N=157), pour une sensibilité de 80 % (88/109) et une spécificité de 77 % (37/48), par comparaison avec les résultats obtenus par l'ELGL (*LLNA* en anglais). La méthode DPRA est susceptible de sous-prédire des produits chimiques ayant un potentiel de sensibilisation de la peau faible à modéré (c'est-à-dire sous-catégorie 1B du SGH/CLP) par rapport aux produits chimiques ayant un potentiel de sensibilisation de la peau élevé (c'est-à-dire sous-catégorie 1A) du SGH/CLP) (18) (19). Cependant, les valeurs relatives à la précision du DPRA utilisé seul n'ont qu'un caractère indicatif, car cette méthode doit être combinée à d'autres sources d'information dans le contexte d'une démarche IATA, et conformément aux dispositions énoncées au paragraphe 9 ci-dessus. Au demeurant, dans l'évaluation des méthodes d'étude de la sensibilisation cutanée sans expérimentation animale, il convient de tenir compte du fait que l'ELGL et les autres méthodes d'expérimentation animale ne reflètent peut-être pas parfaitement la situation chez l'espèce d'intérêt, à savoir l'être humain. Les données actuellement disponibles montrent que le DPRA est applicable à des produits chimiques couvrant divers groupes fonctionnels organiques, mécanismes de réaction, puissances de sensibilisation cutanée (telles qu'établies par des études *in vivo*) et propriétés physico-chimiques (8) (9) (10) (19). L'ensemble de ces données montre l'utilité du DPRA comme élément contribuant à l'identification des dangers de sensibilisation cutanée.

▼M7

Dans la présente méthode d'essai, le terme «produit chimique d'essai» désigne ce qui est testé, et ne fait pas référence à l'applicabilité de la méthode DPRA aux substances et/ou aux mélanges. La présente méthode d'essai n'est pas applicable à l'essai des composés métalliques, qui sont connus pour réagir avec les protéines par des mécanismes autres que la liaison covalente. Les produits chimiques d'essai doivent être solubles dans un solvant approprié à une concentration finale de 100 mM (voir paragraphe 18). Toutefois, les produits chimiques qui ne sont pas solubles à cette concentration peuvent être testés à des concentrations plus basses auxquelles ils sont solubles. Dans ce cas, un résultat positif pourra quand même être utilisé pour étayer l'identification du produit chimique d'essai comme sensibilisant cutané, mais aucune conclusion définitive quant à l'absence de réactivité ne devra être tirée d'un résultat négatif. On dispose actuellement d'informations limitées sur l'applicabilité du DPRA à des mélanges de composition connue (18) (19). On considère néanmoins que le DPRA est techniquement applicable aux essais de substances multi-constituants et de mélanges de composition connue (voir paragraphe 18). Toutefois, avant d'appliquer la présente méthode d'essai à un mélange pour obtenir des données à des fins réglementaires, il convient de vérifier si et, dans l'affirmative, pourquoi les résultats peuvent être acceptables dans le cadre réglementaire imposé. Cette vérification n'est pas nécessaire si l'essai du mélange répond à une exigence réglementaire. Le modèle prédictif actuel n'est pas applicable aux mélanges complexes de composition inconnue ni aux substances de composition inconnue ou variable, aux produits de réaction complexes ou aux matériels biologiques (substances UVCB), compte tenu des quotients molaires définis entre le produit chimique d'essai et le peptide. Pour ces produits, il sera nécessaire de mettre au point un nouveau modèle prédictif fondé sur une approche gravimétrique. Dans les cas où l'on peut apporter la preuve que la méthode d'essai ne peut s'appliquer à d'autres catégories spécifiques de produits chimiques, il convient de ne pas utiliser cette méthode pour tester les catégories en question.

La présente méthode d'essai est une méthode *in chemico*, qui ne fait pas intervenir de système métabolique. Elle ne permet pas d'identifier les produits chimiques requérant une bioactivation enzymatique pour exercer leur pouvoir de sensibilisation cutanée (pro-haptènes). Dans certains cas, les produits chimiques qui deviennent sensibilisants après une transformation abiotique (pré-haptènes) apparaissent comme correctement identifiés par la méthode d'essai (18). A la lumière de ce qui précède, les résultats négatifs obtenus par la méthode d'essai devront être interprétés dans le contexte des limites indiquées et en lien avec d'autres sources d'information dans le cadre d'une démarche IATA. Les produits chimiques qui ne se lient pas de façon covalente au peptide mais qui facilitent son oxydation (p.ex. la dimerisation de la cystéine) peuvent amener à une surestimation potentielle de la déplétion en peptide, pouvant mener à un résultat faussement positif et/ou une assignation du produit chimique d'essai à une classe de réactivité supérieure (voir paragraphes 29 et 30).

Comme indiqué, la méthode DPRA aide à distinguer les sensibilisants cutanés des non-sensibilisants. Cependant, utilisée dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA, elle peut aussi contribuer à l'évaluation de la puissance de sensibilisation (11). Des travaux complémentaires, s'appuyant de préférence sur des données humaines, seront toutefois nécessaires pour déterminer de quelle façon les résultats du DPRA pourraient venir à l'appui de ce type d'évaluation

PRINCIPE DE L'ESSAI

Le DPRA est une méthode *in chemico* qui quantifie la concentration résiduelle de peptide contenant de la cystéine ou de la lysine après 24 heures d'incubation avec le produit chimique d'essai à 25 ± 2,5 °C. Les peptides de synthèse contiennent de la phénylalanine destinée à faciliter la détection. La concentration peptidique relative est mesurée par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) avec élution par gradient et détection UV à 220 nm. Les pourcentages de déplétion de la cystéine et de la lysine sont ensuite établis par calcul et utilisés dans un modèle prédictif (voir paragraphe 29) qui permet d'assigner le produit chimique d'essai à l'une des quatre classes de réactivité utilisées pour distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants.

▼M7

Avant d'utiliser en routine la présente méthode d'essai, les laboratoires devront faire la preuve de leurs compétences techniques, en appliquant la méthode aux dix substances d'épreuve énumérées à l'appendice 2.

MODE OPÉRATOIRE

La présente méthode d'essai est basée sur le protocole DPRA DB-ALM n° 154 (20), qui est celui utilisé pour l'étude de validation coordonnée par l'EURL ECVAM. Il est recommandé d'utiliser ce protocole lors de la mise en œuvre et de l'utilisation de la méthode au laboratoire. On trouvera dans ce qui suit une description des principaux éléments et modes opératoires du DPRA. Dans le cas où un autre système CLHP était utilisé, l'équivalence de ce système par rapport à celui validé dans le protocole DPRA DB-ALM devra être démontrée (p.ex. en testant les substances d'épreuve de compétence citées à l'appendice 2).

Préparation des peptides contenant de la cystéine ou de la lysine

Des solutions mères de cystéine (Ac-RFAA**C**AA-COOH) et de lysine (Ac-RFAA**K**AA-COOH) contenant des peptides de synthèse de pureté supérieure à 85 %, et de préférence de l'ordre de 90-95 %, doivent être fraîchement préparées avant d'être incubées avec le produit chimique d'essai. La concentration finale du peptide à cystéine doit être de 0,667 mM dans un tampon phosphate de pH 7,5, la concentration finale du peptide à lysine de 0,667 mM dans un tampon acétate d'ammonium de pH 10,2. Les séquences d'analyse CLHP doivent être programmées avec pour objectif que le temps de l'analyse CLHP ne dépasse pas 30 heures. Dans le cas du système CLHP utilisé lors de l'étude de validation et décrit dans la présente méthode d'essai, jusqu'à 26 échantillons (comprenant le produit chimique d'essai, le témoin positif et un nombre approprié de solvants témoins, selon le nombre de solvants utilisés dans l'essai, chaque échantillon étant testé en triplicat) peuvent être analysés dans le même passage dans le système CLHP. Tous les réplicats analysés en un même passage doivent utiliser les mêmes solutions mères de peptide à cystéine et à lysine. Il est recommandé d'avoir la preuve de la solubilité des lots individuels de peptides avant leur utilisation.

Préparation du produit chimique d'essai

La solubilité du produit chimique d'essai dans un solvant approprié sera évaluée avant la conduite de l'essai, conformément au mode opératoire décrit dans le protocole DPRA DB-ALM pour la solubilisation (20). Un solvant approprié est un solvant qui dissout complètement le produit chimique d'essai. Dans le DPRA, le produit chimique d'essai est incubé en large excès avec les peptides à cystéine ou à lysine; une inspection visuelle de la solution formée est donc considérée comme suffisante pour vérifier que le produit chimique d'essai (et tous ses composants, dans le cas d'essais portant sur une substance multi-constituants ou un mélange) est bien dissous. Les solvants appropriés sont l'acétonitrile, l'eau, un mélange 1:1 eau:acétonitrile, l'isopropanol, l'acétone ou un mélange 1:1 acétone:acétonitrile. D'autres solvants peuvent être utilisés à condition qu'ils n'aient pas d'incidence sur la stabilité du peptide, d'après les essais réalisés sur des témoins de référence C (échantillons constitués du peptide seul dissous dans le solvant approprié; voir appendice 3). Une dernière option, si le produit chimique d'essai n'est soluble dans aucun de ces solvants, consiste à tenter de le solubiliser dans 300 µL de DMSO et de diluer la solution ainsi obtenue avec 2 700 µl d'acétonitrile; si le produit chimique d'essai n'est pas soluble dans ce mélange, on tentera de solubiliser la même quantité de produit chimique d'essai dans 1 500 µl de DMSO et de diluer la solution obtenue avec 1 500 µl d'acétonitrile. Le produit chimique d'essai doit être pré-pesé dans des flacons en verre, et dissous immédiatement avant l'essai dans un solvant approprié pour préparer une solution à 100 mM. Pour les mélanges et les substances multi-constituants de composition connue, un seul degré de pureté est établi d'après la somme des pourcentages relatifs de leurs constituants (à l'exception de l'eau) et une seule masse moléculaire apparente est établie à partir de la masse moléculaire de chacun des constituants du mélange (à l'exception de l'eau) et de leurs proportions respectives. La pureté et la masse moléculaire apparente obtenues sont alors

▼M7

utilisées pour calculer le poids de produit chimique d'essai nécessaire pour préparer une solution à 100 mM. Dans le cas des polymères pour lesquels il n'est pas possible d'établir une masse moléculaire prédominante, la masse moléculaire du monomère (ou la masse moléculaire apparente des divers monomères constituant le polymère) pourra être prise en compte pour préparer une solution à 100 mM. Cependant, lors de tests sur les mélanges, les substances multi-constituants ou les polymers de compositions connues, on devra envisager de tester aussi le produit chimique pur. Pour les liquides, le produit chimique pur devra être testé tel quel sans dilution préalable, en l'incubant dans des proportions de 1:10 et 1:50 (rapport molaire) avec les peptides lysine et cystéine, respectivement. Pour les solides, le produit chimique devra être dissous à sa concentration maximale de solubilité dans le même solvant utilisé pour la préparation de la solution à 10mM apparents. Le produit chimique devra alors être testé ainsi sans aucune autre dilution en l'incubant dans des proportions de 1:10 et 1: 50 avec les peptides lysine et cystéine, respectivement. Des résultats concordants (réactif ou non réactif) entre la solution à 100 mM apparents et le produit chimique pur devraient permettre de formuler une conclusion définitive.

Préparation du témoin positif, des témoins de référence et des témoins de co-élution

L'aldéhyde cinnamique (n°CAS 104-55-2; pureté grade alimentaire ≥ 95 %) est utilisé comme témoin positif (TP) à une concentration de 100 mM dans l'acétonitrile. D'autres témoins positifs adaptés, donnant de préférence des valeurs de déplétion situées dans une fourchette moyenne, peuvent être utilisés si des données historiques sont disponibles pour dériver des critères d'acceptabilité comparables pour la séquence. En outre, des témoins de référence (échantillons contenant uniquement le peptide dissous dans le solvant approprié) doivent aussi être inclus dans la séquence d'analyse CLHP; ils permettent de s'assurer avant l'analyse que le système CLHP est adapté à l'usage prévu (témoins de référence A), de vérifier la stabilité des témoins de référence dans le temps (témoins de référence B) et de vérifier que le solvant utilisé pour dissoudre le produit chimique d'essai n'a pas d'incidence sur le pourcentage de déplétion des peptides (témoins de référence C) (voir appendice 3). Un témoin de référence approprié est utilisé pour chaque produit chimique afin de calculer le pourcentage de déplétion des peptides lié à cette substance (voir paragraphe 26). De plus, pour chaque produit chimique analysé, un témoin de co-élution constitué du seul produit chimique sera inclus dans la séquence afin de détecter une éventuelle co-élution du produit chimique d'essai avec le peptide à lysine ou à cystéine.

Incubation du produit chimique d'essai avec les solutions de peptide à cystéine et à lysine

Les solutions de peptide à cystéine et à lysine sont mises en incubation avec le produit chimique d'essai dans des flacons en verre pour auto-échantillonneur, dans des proportions de 1:10 et 1:50 respectivement. Si un précipité est observé dès l'ajout de la solution de produit chimique d'essai à la solution de peptide, du fait d'une faible hydrosolubilité du produit chimique d'essai, on ne peut savoir avec certitude quelle est la quantité de produit chimique d'essai restant dans la solution et susceptible de réagir avec le peptide. Dans ce cas, un résultat positif pourra être utilisé, mais un résultat négatif présentera une incertitude et devra être interprété avec prudence (voir également les provisions citées au paragraphe 11 dans le cadre d'essai avec des produits chimiques non solubles à une concentration finale de 100 mM). La solution de réaction doit être maintenue dans l'obscurité à 25 ± 2,5°C pendant 24 ± 2 heures avant l'analyse CLHP. Chaque produit chimique d'essai doit être analysé en triplicat pour les deux peptides. Une inspection visuelle des échantillons est nécessaire avant l'analyse CLHP. Si un précipité ou une séparation de phases sont observés, il est prudent de centrifuger les échantillons à vitesse modérée (100-400xg) afin d'entraîner le précipité au fond du flacon, un excès de précipité risquant de colmater les tubes ou les colonnes du chromatographe. Dans le cas où une précipitation ou une séparation de phases sont observées à la fin de la période d'incubation, la déplétion des peptides peut être sous-estimée et un résultat négatif ne permettra pas de conclure avec une certitude suffisante à l'absence de réactivité.

▼M7

Préparation de la courbe d'étalonnage CLHP

Une courbe d'étalonnage doit être établie pour le peptide à cystéine et le peptide à lysine. Les étalons de peptides sont préparés dans une solution à 20 % ou 25 % acétonitrile:tampon, avec un tampon phosphate (pH 7,5) pour le peptide à cystéine et un tampon acétate d'ammonium (pH 10,2) pour le peptide à lysine. À partir d'étalons obtenus par dilution en série de la solution mère de peptide (0.667 mM), 6 solutions d'étalonnage sont préparées entre 0,34 et 0,0167 mM. Un blanc constitué du tampon de dilution doit être inclus dans la courbe d'étalonnage. Une courbe d'étalonnage adaptée aura un coefficient r^2>0,99.

Préparation et analyse CLHP

Il convient de vérifier avant la conduite de l'analyse si le système est adapté à l'usage prévu. La déplétion de peptides est mesurée par CLHP couplée à un détecteur UV (détecteur à barrette de photodiodes ou détecteur à absorbance UV de longueur d'onde fixe égale à 220 nm). La colonne appropriée est installée dans le système CLHP. L'installation CLHP décrite dans le protocole validé utilise de préférence une colonne Zorbax SB-C-18 2,1 mm x 100 mm x 3,5 microns. Avec cette colonne CLHP à phase inverse, l'ensemble du système doit être équilibré à 30 °C avec 50 % de phase A (0.1 % (v/v) d'acide trifluoroacétique dans l'eau) et 50 % de phase B (0,085 % (v/v) d'acide trifluoroacétique dans l'acétonitrile) pendant 2 heures au moins avant la conduite de l'analyse. L'analyse CLHP doit être réalisée à un débit de 0,35 ml/min pour un gradient linéaire allant de 10 % à 25 % d'acétonitrile pendant 10 minutes, suivi d'une augmentation rapide jusqu'à 90 % d'acétonitrile pour éliminer les autres matériaux. Des volumes égaux de chaque étalon, échantillon et témoin doivent être injectés. La colonne doit être ré-équilibrée aux conditions initiales pendant 7 minutes entre les injections. Si une colonne CLHP à phase inverse d'un modèle différent est utilisée, il peut être nécessaire d'ajuster les paramètres ci-dessus pour assurer une élution et une intégration appropriées des peptides à cystéine et à lysine, en particulier le volume injecté, qui peut varier selon le système utilisé (habituellement entre 3 et 10 µl). Il est essentiel, si des paramètres CLHP différents sont utilisés, de démontrer qu'ils sont équivalents au paramétrage validé décrit ci-dessus (par des essais sur les substances d'épreuve de compétence de l'appendice 2, par exemple). L'absorbance est mesurée à 220 nm. Si un détecteur à barrette de photodiodes est utilisé, l'absorbance à 258 nm doit également être relevée. On notera que certains lots d'acétonitrile peuvent avoir une incidence négative sur la stabilité des peptides, qui doit être évaluée lorsqu'un nouveau lot d'acétonitrile est utilisé. Le rapport entre la surface du pic à 220 nm et la surface du pic à 258 nm peut servir d'indicateur de co-élution. Pour chaque échantillon, un rapport compris entre 90 et 100 % de la moyenne ([1]) des rapports des surfaces obtenue pour les échantillons témoins constitue un bon indicateur de l'absence de co-élution.

Certains produits chimiques d'essai peuvent promouvoir l'oxydation du peptide à cystéine. Le pic du peptide à cystéine dimérisé peut être observé visuellement. S'il apparaît qu'une dimérisation s'est produite, il convient de le noter, car le pourcentage de déplétion du peptide peut être surestimé, amenant à une prédiction faussement positive et/ou une assignation à une classe de réactivité supérieure (voir paragraphes 29 et 30).

L'analyse CLHP des peptides à cystéine et des peptides à lysine peut être réalisée le même jour, si l'on dispose de deux systèmes CLHP. Si les deux analyses ne sont pas réalisées le même jour, toutes les solutions de produit chimique d'essai doivent être chaque fois fraîchement préparées pour l'essai. L'analyse doit être programmée dans le temps de telle sorte que l'injection du premier échantillon commence 22 à 26 heures après le mélange du produit chimique d'essai avec la solution de peptide. Les séquences d'analyse CLHP doivent être programmées

([1]) Le terme de «moyenne», dans le présent document, est entendu au sens de «moyenne arithmétique».

▼M7

dans le souci de maintenir le temps d'analyse en-deçà de 30 heures. Dans le cas du système CLHP utilisé dans l'étude de validation et décrit dans la présente méthode d'essai, un maximum de 26 échantillons peuvent être analysés lors d'un même passage dans le système CLHP (voir aussi paragraphe 17). On trouvera à l'appendice 3 un exemple de séquence d'analyse CLHP.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation des données

On établit de manière photométrique à 220 nm pour chaque échantillon, la concentration de peptide à lysine ou à cystéine, en mesurant la surface des pics appropriés par intégration des pics (tout ce qui se situe sous la courbe) et en calculant la concentration peptidique d'après la courbe d'étalonnage linéaire établie à partir des étalons.

On établit pour chaque échantillon le pourcentage de déplétion des peptides en mesurant la surface des pics et en la divisant par la surface moyenne des pics des témoins de référence C correspondants (voir appendice 3) selon la formule ci-après.

$$\textit{Pourcentage de déplétion des peptides} = \left[1 - \left(\frac{\textit{Surface du pic peptidique pour le réplicat}}{\textit{Surface moyenne des pics peptidiques des témoins de référence C}}\right)\right] \times 100$$

Critères d'acceptabilité

Les critères suivants doivent être remplis pour qu'un essai soit considéré comme valide:

a) la courbe d'étalonnage doit avoir un coefficient $r^2 > 0{,}99$;

b) le pourcentage moyen de déplétion des peptides des trois réplicats pour le témoin positif à l'aldéhyde cinnamique doit se situer entre 60,8 % et 100 % pour le peptide à cystéine et entre 40,2 % et 69 % pour le peptide à lysine, et l'écart type maximal pour les réplicats du témoin positif doit être < 14,9 % pour le taux de déplétion de la cystéine et < 11,6 % pour le taux de déplétion de la lysine;

c) la concentration peptidique moyenne des témoins de référence A doit être de 0,50 ± 0,05 mM et le coefficient de variation (CV) des surfaces des pics peptidiques doit être < 15,0 % pour les neuf témoins de référence B et C dans l'acétonitrile.

Si un seul ou plusieurs de ces critères ne sont pas remplis, l'essai doit être répété.

Les critères suivants doivent être remplis pour que les résultats relatifs à un produit chimique d'essai soient considérés comme valides:

a) l'écart type maximal pour les réplicats du produit chimique d'essai doit être < 14,9 % pour le taux de déplétion de la cystéine et < 11,6 % pour le taux de déplétion de la lysine,

b) la concentration peptidique moyenne des trois témoins de référence C dans le solvant approprié doit être de 0,50 ± 0,05 mM. Si ces critères ne sont pas remplis, les données doivent être rejetées et l'essai doit être répété pour le produit chimique d'essai considéré.

Modèle prédictif

Le pourcentage moyen de déplétion de la cystéine et de la lysine est calculé pour chaque produit chimique d'essai. Une déplétion négative est considérée comme égale à 0 pour le calcul de la moyenne. Si l'on utilise le modèle prédictif cystéine 1:10/lysine 1:50 du tableau 1, c'est le seuil de 6,38 % de déplétion peptidique moyenne qui sera pris en compte pour l'identification des sensibilisants et des non-sensibilisants cutanés dans le cadre d'une approche IATA. L'application du modèle prédictif pour assigner un produit chimique d'essai à une classe de réactivité (réactivité faible, modérée ou forte) permettra peut-être d'obtenir des informations utiles pour évaluer la puissance de sensibilisation de ce produit chimique dans le cadre d'une approche de type IATA.

▼M7

Tableau 1

Modèle prédictif [1] cystéine 1:10/ lysine 1:50

Pourcentage moyen de déplétion de la cystéine et de la lysine	Classe de réactivité	Prédiction DPRA [2]
0 % ≤ % moyen de déplétion ≤ 6,38 %	Réactivité nulle ou minimale	Négative
6,38 % < % moyen de déplétion ≤ 22,62 %	Faible réactivité	Positive
22,62 % < % moyen de déplétion ≤ 42,47 %	Réactivité modérée	
42,47 % < % moyen de déplétion ≤ 100 %	Forte réactivité	

[1] Les chiffres correspondent à des valeurs seuils obtenues par traitement statistique, et ne se rapportent pas à la précision de la mesure.
[2] Une prédiction DPRA doit être envisagée dans le cadre d'une démarche de type IATA et conformément aux dispositions des paragraphes 9 et 12.

Il peut arriver que le produit chimique d'essai (la substance, ou l'un ou plusieurs des composants d'une substance multi-constituants ou d'un mélange) donne lieu à une absorption significative à 220 nm et ait le même temps de rétention que le peptide (co-élution). La co-élution peut être résolues par un léger ajustement du système d'analyse CLHP afin de mieux séparer les temps de rétention entre le produit chimique d'essai et le peptide. Si un autre système d'analyse CLHP est employé dans l'objectif de résoudre cette problématique de co-élution, son équivalence au sytème CLHP validé dans la présente ligne directrice devra être démontrée (p.ex. au moyen des substances d'épreuve de compétence citées à l'appendice 2) Dans les cas de co-élution, le pic du peptide ne peut pas être intégré, et il n'est pas possible de calculer le pourcentage de déplétion des peptides. Si la co-élution pour ce produit chimique d'essai concerne à la fois les peptides à cystéine et à lysine, l'analyse est considérée comme «non concluante». Si la co-élution n'intervient que pour le peptide à lysine, le modèle prédictif du tableau 2 pour la cystéine 1:10 est applicable.

Tableau 2

Modèle prédictif [1] cystéine 1:10

Pourcentage de déplétion de la cystéine (Cys)	Classe de réactivité	Prédiction DPRA [2]
0 % ≤ % déplétion Cys ≤ 13,89 %	Réactivité nulle ou minimale	Négative
13,89 % < % déplétion Cys ≤ 23,09 %	Faible réactivité	Positive
23,09 % < % déplétion Cys ≤ 98,24 %	Réactivité modérée	
98,24 % < % déplétion Cys ≤ 100 %	Forte réactivité	

[1] Les chiffres correspondent à des valeurs seuils obtenues par traitement statistique, et ne se rapportent pas à la précision de la mesure.
[2] Une prédiction DPRA doit être envisagée dans le cadre d'une démarche de type IATA et conformément aux dispositions des paragraphes 9 et 12.

Il peut également y avoir des cas où les temps de rétention du produit chimique d'essai et de l'un des peptides ne se recouvrent pas complètement. Les pourcentages de déplétion peuvent alors être estimés et utilisés dans le modèle prédictif cystéine 1:10/lysine 1:50, sans qu'il soit possible de classer avec précision le produit chimique d'essai dans l'une des classes de réactivité.

▼M7

Pour un produit chimique d'essai, une seule analyse CLHP pour le peptide à cystéine et le peptide à lysine devrait suffire si le résultat est sans équivoque. Cependant, lorsque les données disponibles pour déterminer si un résultat limite est positif ou négatif sont proches du seuil, des tests complémentaires peuvent être nécessaires. Si le pourcentage moyen de déplétion se situe dans l'intervalle 3 % à 10 % pour la cystéine 1:10/lysine 1:50, ou si le pourcentage de déplétion de la cystéine se situe dans l'intervalle 9 % à 17 % pour la cystéine 1:10, une deuxième analyse doit être envisagée, voire une troisième en cas de résultats discordants entre les deux premières.

Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes:

Produit chimique d'essai

— Substance mono-constituant:

  — Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants;

  — Apparence physique, hydrosolubilité, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;

  — Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;

  — Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);

  — Concentration(s) testée(s);

  — Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

— Substance multi-constituants, UVCB ou mélange:

  — Caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;

  — Apparence physique, hydrosolubilité et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;

  — Masse moléculaire ou masse moléculaire apparente dans le cas de mélanges/polymères de composition connue ou autres informations pertinentes pour la conduite de l'étude;

  — Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);

  — Concentration(s) testée(s);

  — Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Témoins

— Témoin positif

  — Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants;

  — Apparence physique, hydrosolubilité, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;

  — Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;

▼M7

— Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);

— Concentration(s) testée(s);

— Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;

— Référence aux données historiques relatives aux témoins positifs démontrant la conformité aux critères d'acceptabilité, s'il y a lieu.

— Solvant/véhicule

— Solvant/véhicule utilisé et teneur de chacun de ses constituants, s'il y a lieu;

— Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS et/ou autres identifiants;

— Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;

— Apparence physique, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, si des solvants / véhicules autres que ceux mentionnés dans la méthode d'essai sont utilisés, et selon les données disponibles;

— Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;

— Justification du choix du solvant pour chaque produit chimique d'essai;

— Pour l'acétonitrile, résultats du test d'impact sur la stabilité des peptides.

Préparation des peptides, du témoin positif et du produit chimique d'essai

— Caractérisation des solutions peptidiques (fournisseur, lot, poids exact de peptide, volume ajouté pour préparer la solution mère);

— Caractérisation de la solution contenant le témoin positif (poids exact de substance témoin, volume ajouté pour préparer la solution d'essai);

— Caractérisation des solutions de produit chimique d'essai (poids exact de produit chimique d'essai, volume ajouté pour préparer la solution d'essai).

Paramètres et analyse CLHP

— Type de système CLHP, colonne CLHP et colonne de garde, détecteur, auto-échantillonneur;

— Paramètres pertinents pour l'analyse CLHP, tels que la température de la colonne, les volumes injectés, le débit et le gradient.

Adéquation du système

— Aire des pics peptidiques à 220 nm pour chaque réplicat d'étalon et de témoin de référence A;

— Représentation graphique des courbes d'étalonnage linéaires et indication de leur coefficient r^2;

— Concentration peptidique de chaque réplicat du témoin de référence A;

— Concentration peptidique moyenne (mM) des trois témoins de référence A, écart type et coefficient de variation;

— Concentration peptidique des témoins de référence A et C.

▼**M7**

Séquence d'analyse

— Pour les témoins de référence:

  — Aire des pics peptidiques à 220 nm pour chaque réplicat B et C;

  — Aire moyenne des pics peptidiques à 220 nm pour les neuf témoins de référence B et C dans l'acétonitrile, écart type et coefficient de variation (vérification de la stabilité des témoins de référence du début à la fin de l'analyse);

  — Pour chaque solvant utilisé, aire moyenne des pics peptidiques à 220 nm pour les trois témoins de référence C appropriés (pour le calcul du pourcentage de déplétion des peptides);

  — Pour chaque solvant utilisé, concentration peptidique (mM) pour les trois témoins de référence C appropriés;

  — Pour chaque solvant utilisé, concentration peptidique moyenne (mM) pour les trois témoins de référence C appropriés, écart type et coefficient de variation.

— Pour le témoin positif:

  — Aire des pics peptidiques à 220 nm pour chaque réplicat;

  — Pourcentage de déplétion des peptides pour chaque réplicat;

  — Taux moyen de déplétion des peptides pour les trois réplicats, écart type et coefficient de variation.

— Pour chaque produit chimique d'essai:

  — Apparence du précipité dans le mélange de réaction à la fin du temps d'incubation, s'il y a lieu. Indiquer si le précipité a été re-solubilisé ou centrifugé;

  — Présence d'une co-élution;

  — Description de toutes autres observations pertinentes, s'il y a lieu;

  — Aire des pics peptidiques à 220 nm pour chaque réplicat;

  — Pourcentage de déplétion des peptides pour chaque réplicat;

  — Pourcentage moyen de déplétion des peptides pour les trois réplicats, écart type et coefficient de variation;

  — Pourcentages moyens de déplétion pour la cystéine et pour la lysine;

  — Modèle prédictif utilisé et prédiction DPRA.

Épreuves de compétence

— S'il y a lieu, les procédures utilisées pour démontrer la compétence du laboratoire dans l'application de la méthode d'essai (en testant les substances d'épreuve, par exemple) ou pour démontrer une application reproductible dans le temps de la méthode d'essai.

Discussion des résultats

— Discussion des résultats obtenus par la méthode d'essai DPRA;

— Discussion des résultats de la méthode d'essai dans le contexte d'une démarche intégrée (IATA), si d'autres informations pertinentes sont disponibles.

Conclusions

▼**M7**

BIBLIOGRAPHIE

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. disponible à l'adresse: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation n° 168. OCDE, Paris.

(3) Chapitre B.6 de la présente annexe: Sensibilisation cutanée.

(4) Chapitre B.42 de la présente annexe: Essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques

(5) Chapitre B.50 de la présente annexe: Sensibilisation cutanée: essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques: DA.

(6) Chapitre B.51 de la présente annexe: Sensibilisation cutanée: essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques: BrdU-ELISA

(7) Adler S *et al*. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Archives of Toxicology* 85, 367-485.

(8) Gerberick *et al*. (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicological Sciences* 81:332-343.

(9) Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. *Toxicological Sciences* 97:417-427.

(10) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Accessible à l'adresse suivante: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

(11) Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *Journal of Applied Toxicology*, publié en ligne, 14 mai 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

(12) Bauch *et al*. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 63: 489-504.

(13) Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. *Toxicology in vitro* 27:609 618.

(14) Ball *et al* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 60:389-400.

(15) Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *Journal of Experimental Medicine* 64:625-639.

(16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.

(17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.

(18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74pp. Accessible à l'adresse suivante: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

▼**M7**

(19) Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, publié en ligne, 9 avril 2013, DOI:10.1002/jat.2868.

(20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Accessible à l'adresse suivante: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

(21) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Série sur les essais et l'évalutaions, n° 34. Organisation pour la coopération et le développement économiques, Paris.

(22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Accessible à l'adresse suivante: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf — 138

(23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

▼**M7**

Appendice 1

DEFINITIONS

Chemical: A substance or a mixture.

Adéquation du système: Détermination des performances des instruments (sensibilité, par exemple) par l'analyse d'un étalon de référence préalablement à la mise à l'épreuve du lot analytique (22).

AOP (*Adverse Outcome Pathway,* voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables**)**: séquence d'événements conduisant à la survenue d'un effet indésirable *in vivo*, à partir de la structure chimique d'un produit chimique cible ou d'un groupe de produits chimiques similaires et de l'événement initiateur au niveau moléculaire (2).

Coefficient de variation: la mesure de la variabilité calculée pour un groupe de données issues de réplicats en divisant la déviation standard par la moyenne. Cette mesure peut être multipliée par 100 pour obtenir un pourcentage.

Courbe d'étalonnage: Relation entre la réponse expérimentale et la concentration analytique (aussi appelée *courbe étalon*) d'une substance d'essai connue.

Danger: Propriété inhérente d'un agent ou d'une situation susceptible de provoquer des effets indésirables lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-) population est exposé(e) à cet agent.

Événement moléculaire initiateur: Perturbation d'un système biologique induite par un produit chimique au niveau moléculaire, identifiée comme le point de départ de la voie impliquée dans un effet indésirable (AOP).

Fiabilité: Indique dans quelle mesure la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au cours du temps par un même laboratoire ou plusieurs laboratoires utilisant le même mode opératoire. Pour l'évaluer, on calcule la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires et la répétabilité intra-laboratoire (21).

IATA (*Integrated Approaches to Testing and Assessment* , approches intégrées en matière d'essais et d'évaluation**)**: Approche structurée utilisée dans l'identification du danger (potentiel), la caractérisation du danger (puissance) et/ou dans l'évaluation'de la sécurité (potentiel de danger/puissance du danger et exposition) d'un produit chimique ou d'un groupe de produits chimiques, qui intègre de façon stratégique et pondérée toutes les données pertinentes dans le but d'informer une décision réglementaire sur le danger potentiel et/ou le risque et/ou le besoin d'effectuer d'autres tests ciblés.

Mélange: Mélange ou solution constitué(e) de deux substances ou plus qui ne réagissent pas entre elles (1).

Méthode d'essai validée: Méthode d'essai ayant fait l'objet d'études de validation visant à déterminer sa pertinence (notamment sa précision) et sa fiabilité à des fins spécifiques. Il importe de noter que les performances d'une méthode d'essai validée peuvent être insuffisantes en termes de précision et de fiabilité pour qu'elle puisse être jugée acceptable pour l'objectif envisagé (21).

Pertinence: Décrit la relation entre l'essai et l'effet étudié, et rend compte de l'adéquation de l'essai et de son utilité à des fins spécifiques. La pertinence indique dans quelle mesure l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. Elle tient compte de la précision (concordance) de la méthode d'essai (21).

Précision: Étroitesse de l'accord entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la

▼M7

méthode d'essai et l'un des aspects de sa «pertinence». Ce terme est souvent utilisé au sens de «concordance», pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (21).

Produit chimique: une substance ou un mélange

Produit chimique d'essai: Le terme «produit chimique d'essai» désigne ce qui est testé.

Reproductibilité: Accord entre les résultats obtenus lors d'essais pratiqués sur le même produit chimique selon le même mode opératoire (voir Fiabilité) (21).

Sensibilité: Proportion des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par la méthode d'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (21).

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies): Système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans l'objectif de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (1).

Spécificité: Proportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont classés correctement par la méthode d'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (21).

Substance: Élément chimique et ses composés, présents à l'état naturel ou obtenus grâce à un procédé de production. Ce terme inclut tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit ainsi que toute impureté produite par le procédé utilisé, mais exclut tout solvant pouvant être extrait sans affecter la stabilité ni modifier la composition de la substance (1).

Substance mono-constituant: Substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un constituant principal est présent à une concentration d'au moins 80 % (P/P).

Substance multi-constituants: Substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant principal est présent à une concentration comprise entre 10 % et 80 % (P/P). Une substance multi-constituants résulte d'un processus de fabrication. La différence entre un mélange et une substance multi-constituants est que le mélange est obtenu en associant deux substances ou plus sans réaction chimique. Une substance multi-constituants résulte d'une réaction chimique.

Témoin de référence: Échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, y compris le solvant ou le véhicule utilisé pour préparer les échantillons traités ou non avec le produit chimique d'essai, et servant à déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique d'essai dissous dans le même solvant ou véhicule. Testé avec un témoin négatif concomitant, cet échantillon indique également si le solvant ou véhicule interagit avec le système d'essai.

Témoin positif: Réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec une substance connue pour induire une réponse positive. Pour qu'il soit possible d'évaluer la variabilité dans le temps de la réponse du témoin positif, l'intensité maximale de celle-ci ne doit pas être excessive.

UVCB: Substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques.

▼M7

Appendice 2

SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE

Sensibilisation cutanée *in chemico*: essai de réactivité peptidique direct (DPRA)

Avant d'utiliser en routine la méthode d'essai décrite dans la présente Ligne directrice, les laboratoires doivent démontrer leurs compétences techniques en obtenant les prédictions attendues par la méthode DPRA pour les 10 substances d'épreuve de compétence recommandées au tableau 1, et en obtenant des valeurs de déplétion de la cystéine et de la lysine se situant dans les domaines de référence respectifs de ces deux grandeurs pour au moins 8 des 10 substances d'épreuve de compétence. Ces substances ont été sélectionnées de façon à représenter la gamme des réponses possibles en ce qui concerne les dangers de sensibilisation cutanée. Les autres critères de sélection sont la disponibilité des substances dans le commerce, la qualité élevée des données de référence *in vivo* disponibles et des données *in vitro* obtenues par le DPRA, ainsi que l'utilisation de ces substances dans l'étude de validation coordonnée par l'EURL ECVAM pour démontrer que la méthode d'essai a été mise en œuvre avec succès dans les laboratoires participant à l'étude.

Tableau 1

Substances d'épreuve recommandées pour démontrer les compétences techniques des laboratoires relatives à l'essai réactivité peptidique direct (DPRA)

Substances d'épreuve de compétence	N°CAS	État physique	Prédiction *in vivo* [1]	Prédiction DPRA [2]	Intervalle de variation [3] du % de déplétion du peptide à cystéine	Intervalle de variation [3] du % de déplétion du peptide à lysine
2,4-Dinitrochlorobenzène	97-00-7	Solide	Sensibilisant (extrême)	Positive	90-100	15-45
Oxazolone	15646-46-5	Solide	Sensibilisant (extrême)	Positive	60-80	10-55
Formaldéhyde	50-00-0	Liquide	Sensibilisant (fort)	Positive	30-60	0-24
Benzylidène-acétone	122-57-6	Solide	Sensibilisant (modéré)	Positive	80-100	0-7
Farnesal	19317-11-4	Liquide	Sensibilisant (faible)	Positive	15-55	0-25
2,3-Butanedione	431-03-8	Liquide	Sensibilisant (faible)	Positive	60-100	10-45
1-Butanol	71-36-3	Liquide	Non-sensibilisant	Négative	0-7	0-5,5
6-Méthylcoumarine	92-48-8	Solide	Non-sensibilisant	Negative	0-7	0-5,5
Acide lactique	50-21-5	Liquide	Non-sensibilisant	Négative	0-7	0-5,5
4-Méthoxyacétophénone	100-06-1	Solide	Non-sensibilisant	Négative	0-7	0-5,5

([1]) La prédiction *in vivo* des dangers (et de la puissance sensibilisante) est fondée sur les données ELGL (19). La puissance in vivo est déterminée à partir de critères proposés par ECETOC (23).

([2]) Une prédiction DPRA doit être envisagée dans le cadre d'une démarche de type IATA et conformément aux dispositions des paragraphes 9 et 11.

([3]) Intervalles déterminés sur la base d'au moins 10 valeurs de déplétion établies par 6 laboratoires indépendants.

▼M7

Appendice 3

EXEMPLE DE SÉQUENCE D'ANALYSE

Étalons et témoins de référence	Étalon 1 Étalon 2 Étalon 3 Étalon 4 Étalon 5 Étalon 6 Tampon de dilution Témoin de référence A, rép. 1 Témoin de référence A, rép. 2 Témoin de référence A, rép. 3
Témoins de co-élution	Témoin de co-élution pour le produit chimique d'essai 1 Témoin de co-élution pour le produit chimique d'essai 2
Témoins de référence	Témoin de référence B, rép. 1 Témoin de référence B, rép. 2 Témoin de référence B, rép. 3
Première série de réplicats	Témoin de référence C, rép. 1 Aldéhyde cinnamique, rép. 1 Échantillon 1, rép. 1 Échantillon 2, rép. 1
Deuxième série de réplicats	Témoin de référence C, rép. 2 Aldéhyde cinnamique, rép. 2 Échantillon 1, rép. 2 Échantillon 2, rép. 2
Troisième série de réplicats	Témoin de référence C, rép. 3 Aldéhyde cinnamique, rép. 3 Échantillon 1, rép. 3 Échantillon 2, rép. 3
Témoins de référence	Témoin de référence B, rép. 4 Témoin de référence B, rép. 5 Témoin de référence B, rép. 6

Trois séries de témoins de référence (échantillons constitués seulement de peptide dissous dans le solvant approprié) doivent être incluses dans la séquence d'analyse:
Témoin de référence A: utilisé pour vérifier l'adéquation du système CLHP.
Témoin de référence B: inclus au début et à la fin de la séquence d'analyse pour vérifier la stabilité des témoins de référence du début à la fin de l'analyse.
Témoin de référence C: inclus dans la séquence d'analyse pour vérifier que le solvant utilisé pour dissoudre le produit chimique d'essai n'a pas d'incidence sur le pourcentage de déplétion des peptides.

▼M7

B.60. SENSIBILISATION CUTANÉE *IN VITRO*: MÉTHODE D'ESSAI ARE-NRF2 LUCIFÉRASE

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 442D (2015) de l'OCDE. Un sensibilisant cutané est une substance qui provoque une réponse allergique suite à un contact avec la peau, selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (SGH) (1) et du règlement (CE) n° 1272/2008 de l'Union européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (CLP) ([1]). La présente méthode d'essai décrit une procédure *in vitro* (essai ARE-Nrf2 luciférase) qui doit aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés, selon le SGH (1) et le CLP.

Les principales phases du processus biologique de sensibilisation cutanée font l'objet d'un consensus général. Les connaissances dont on dispose sur les mécanismes chimiques et biologiques associés à la sensibilisation sont résumées sous la forme d'une voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables (AOP, *Adverse Outcome Pathway*) (2) allant de l'événement moléculaire initiateur jusqu'aux effets indésirables sur la santé que sont la dermatite de contact allergique chez l'homme ou l'hypersensibilité de contact chez les rongeurs (2) (3), en passant par les étapes intermédiaires. L'événement moléculaire initiateur est l'établissement d'une liaison covalente entre des substances chimiques électrophiles et les centres nucléophiles des protéines de la peau. Le deuxième événement clé sur cet AOP se déroule dans les kératinocytes et comprend des réponses inflammatoires et des phénomènes d'expression génique, liés à des voies de signalisation cellulaire spécifiques telles que les voies dépendant de l'élément de réponse antioxydant/électrophile (ARE, *Antioxidant Response Element*). Le troisième événement clé est l'activation des cellules dendritiques, habituellement évaluée d'après l'expression de marqueurs de surface spécifiques de la cellule, les chimiokines et les cytokines. Le quatrième événement clé est la prolifération des lymphocytes T, évaluée indirectement par l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL) chez la souris (4).

Traditionnellement, l'évaluation de la sensibilisation cutanée a fait appel à l'expérimentation animale. Les méthodes classiques — test de maximisation chez le cobaye (GPMT) de Magnusson et Kligman et test de Buehler, également chez le cobaye [méthode d'essai B.6 (5)] — portent sur les phases d'induction et d'élicitation de la sensibilisation cutanée. Un essai sur la souris, l'ELGL [méthode d'essai B.42 (4)], et ses deux variantes n'utilisant pas d'isotopes radioactifs, l'ELGL: DA (méthode d'essai B.50 (6)] et l'ELGL: BrdU-ELISA [méthode d'essai B.51 (7)], tous trois portant exclusivement sur la réponse à l'induction, se sont également imposés, car ils présentent l'avantage, par rapport aux tests sur le cobaye, de préserver davantage le bien-être animal et de fournir une mesure objective de la phase d'induction de la sensibilisation cutanée.

Plus récemment, des méthodes d'essai *in chemico* et *in vitro* de type mécanistique ont été considérées comme scientifiquement valides pour l'évaluation du danger de sensibilisation cutanée lié aux produits chimiques. Cependant des combinaisons de méthodes de substitution à l'expérimentation animale (méthodes *in silico*, *in chemico*, *in vitro*) seront nécessaires, dans le cadre des approches intégrées en matière d'essais et d'évaluation (IATA, *Integrated Approaches to Testing and Assessment*), pour qu'il soit possible de remplacer complètement les essais sur l'animal actuellement pratiqués, compte tenu de la restriction de chacune de ces méthodes pour ce qui est de la couverture mécanistique de l'AOP (2) (3).

La présente méthode d'essai (essai ARE-Nrf2 luciférase) est proposée pour l'étude de la deuxième étape décrite au paragraphe 2. Les sensibilisants cutanés ont été signalés comme provoquant l'induction de gènes qui sont régulés par l'élément de réponse antioxydant (ARE) (8) (9). Des substances électrophiles de petite taille

([1]) Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006.

▼M7

telles que les sensibilisants cutanés peuvent agir sur la protéine détectrice Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), par exemple par une modification covalente de son résidu cystéine l'amenant à se dissocier du facteur de transcription Nrf2 (*nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*). Le facteur Nrf2 dissocié peut alors activer les gènes dépendants de l'ARE, tels que ceux qui codent les enzymes détoxifiantes de phase II (8) (10) (11).

A l'heure actuelle, le seul essai ARE-Nrf2 luciférase *in vitro* couvert par la présente méthode d'essai est l'essai KeratinoSens™, qui a donné lieu à des études de validation (9) (12) (13) suivies d'un examen indépendant par des pairs, conduit par le Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les méthodes de substitution à l'expérimentation animale (EURL ECVAM) (14). L'essai KeratinoSens™ a été considéré comme scientifiquement valide, dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA, pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés à des fins de classification et d'étiquetage des dangers (14). Les laboratoires souhaitant appliquer cette méthode d'essai peuvent obtenir la lignée cellulaire recombinante utilisée dans l'essai KeratinoSens™ en établissant un accord de licence avec le développeur de la méthode (15).

Les définitions sont données à l'appendice 1.

CONSIDÉRATIONS PRÉLIMINAIRES, APPLICABILITÉ ET LIMITES

L'activation de la voie Keap1-Nrf2-ARE ne concernant que la deuxième étape de l'AOP relative à la sensibilisation cutanée, les informations obtenues à l'aide de méthodes d'essai fondées sur l'activation de cette voie ne sont peut-être pas suffisantes à elles seules, pour établir le potentiel de sensibilisation cutanée de produits chimiques. Il convient donc de considérer les données issues de l'application de la présente méthode d'essai dans le contexte d'une approche intégrée de type IATA, en combinant ces données à d'autres informations complémentaires provenant par exemple d'essais *in vitro* portant sur d'autres étapes-clé de l'AOP sensibilisation cutanée, ainsi que de méthodes non expérimentales telles que la prévision à partir de données croisées (*read-across*) relatives à des produits chimiques similaires. On trouvera dans la littérature des exemples d'utilisation de la méthode d'essai ARE-Nrf2 luciférase combinée à d'autres sources d'information (13) (16) (17) (18) (19).

La présente méthode d'essai peut apporter une aide à l'identification des sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH/CLP) et des non-sensibilisants, dans le cadre d'une approche intégrée (IATA). Cette méthode d'essai ne peut pas être utilisée seule, ni pour le classement des sensibilisants cutanés dans les sous-catégories 1A et 1B du SGH/CLP optionnelles, ni pour prédire la puissance de sensibilisation dans le cadre d'évaluations de sécurité. Cependant, en fonction du cadre réglementaire applicable, un résultat positif peut être considéré comme suffisant à lui seul pour classer un produit chimique dans la catégorie 1 du SGH/CLP.

D'après l'ensemble des données issues de l'étude de validation et des tests pratiqués en interne lors de l'examen indépendant de la méthode d'essai par des pairs, la méthode KeratinoSens™ est transférable à des laboratoires expérimentés dans le domaine des cultures cellulaires. Le niveau de reproductibilité attendu des prédictions est de l'ordre de 85 % intra- et inter-laboratoires (14). Par ailleurs, l'exactitude (77 % -155/201), la sensibilité (78 % — 71/91) et la spécificité (76 % — 84/110) des prédictions obtenues par l'essai KeratinoSens™ pour déterminer les sensibilisants (catégorie 1 du SGH/CLP) des non-sensibilisants, comparées aux résultats de l'ELGL, ont été calculées en prenant en compte toutes les données soumises à l'EURL ECVAM pour l'évaluation et l'examen par des pairs (14). Ces chiffres sont similaires à ceux récemment publiés à l'issue d'essais en interne portant sur quelque 145 substances chimiques (précision 77 %, sensibilité 79 %, spécificité 72 %) (13). L'essai KeratinoSens™ est susceptible de sous-prédire des produits chimiques ayant un potentiel de sensibilisation de la peau faible à modéré (c'est-à-dire sous-catégorie 1B du SGH/CLP) par rapport aux produits chimiques ayant un potentiel de sensibilisation de la peau élevé

▼M7

(c'est-à-dire sous-catégorie 1A) du SGH/CLP (13) (14). L'ensemble de ces données montre l'utilité de l'essai KeratinoSens™ comme élément contribuant à l'identification des dangers de sensibilisation cutanée. Cependant, les valeurs relatives à la précision de la méthode reposant uniquement sur l'essai KeratinoSens™ n'ont qu'un caractère indicatif, car cette méthode doit être combinée à d'autres sources d'information dans le contexte d'une démarche IATA, et conformément aux dispositions énoncées au paragraphe 9 ci-dessus. Au demeurant, dans l'évaluation des méthodes d'étude de la sensibilisation cutanée sans expérimentation animale, il convient de tenir compte du fait que l'ELGL et les autres méthodes d'expérimentation animale ne reflètent peut-être pas parfaitement la situation chez l'espèce d'intérêt, à savoir l'être humain.

Dans la présente méthode d'essai, le terme «produit chimique d'essai» désigne ce qui est testé, et ne fait pas référence à l'applicabilité de la méthode d'essai ARE-Nrf2 luciférase aux substances et/ou aux mélanges. Les données actuellement disponibles montrent que l'essai KeratinoSens™ est applicable à des produits chimiques couvrant divers groupes fonctionnels organiques, mécanismes de réaction, puissances de sensibilisation cutanée (telles qu'établies par des études *in vivo*) et propriétés physico-chimiques (9) (12) (13) (14). Ce sont principalement des substances mono-constituant qui ont été testées, même si l'on dispose également d'un nombre limité de données relatives à l'essai de mélanges (20). La méthode est néanmoins techniquement applicable aux essais de substances multi-constituants et de mélanges. Toutefois, avant d'appliquer la présente méthode d'essai à un mélange pour obtenir des données à des fins réglementaires, il convient de vérifier si et, dans l'affirmative, pourquoi les résultats peuvent être acceptables dans le cadre réglementaire imposé. Cette vérification n'est pas nécessaire si l'essai du mélange répond à une exigence réglementaire. De plus, en cas d'essai portant sur des substances multi-constituants ou des mélanges, il convient de s'interroger sur l'interférence possible de constituants cytotoxiques avec les réponses observées. La méthode d'essai est applicable aux produits chimiques solubles ou formant une dispersion stable (colloïde ou suspension dans laquelle le produit chimique d'essai ne se dépose pas et ne se sépare pas du solvant en formant plusieurs phases) dans l'eau ou dans le DMSO (cela vaut pour tous les constituants du produit chimique d'essai si l'essai porte sur une substance multi-constituants ou un mélange). Les produits chimiques d'essai qui ne remplissent pas ces conditions à la concentration finale maximale requise de 2 000 μM (cf. paragraphe 22) peuvent néanmoins être testés à des concentrations plus faibles. Dans ce cas, les résultats remplissant les critères de positivité décrits au paragraphe 39 peuvent quand même être utilisés pour étayer l'identification du produit chimique d'essai comme sensibilisant cutané, tandis qu'un résultat négatif obtenu pour des concentrations < 1 000 μM sera considéré comme non concluant (voir le modèle prédictif au paragraphe 39). D'une manière générale, les substances ayant un LogP calculé inférieur ou égal à 5 ont été testés avec succès, alors que les substances extrêmement hydrophobes dont le LogP calculé est supérieur à 7 se situent en dehors des limites connues d'applicabilité de la méthode d'essai (14). Pour les substances ayant un LogP calculé compris entre 5 et 7, les informations disponibles sont limitées.

Les résultats négatifs sont à interpréter avec prudence, car les substances réactives exclusivement vis-à-vis des résidus lysine peuvent être identifiées comme négatives par la méthode d'essai. De plus, en raison des capacités métaboliques limitées de la lignée cellulaire utilisée (21), ainsi que des conditions expérimentales, les pro-haptènes (produits chimiques nécessitant une activation enzymatique, par exemple via des enzymes P450) et les pré-haptènes (produits chimiques activés par auto-oxydation), en particulier ceux dont l'oxydation est lente, peuvent eux aussi donner des résultats négatifs. A l'inverse, les produits chimiques d'essai qui n'agissent pas comme des sensibilisants, mais sont néanmoins des facteurs de stress chimique, peuvent donner lieu à des faux positifs (14). De plus, lorsque les produits chimiques d'essai sont fortement cytotoxiques, ils ne peuvent pas toujours être évalués de façon fiable. Enfin, les produits chimiques d'essai qui interfèrent avec la luciférase peuvent créer un risque de confusion avec l'activité de la luciférase, dans les essais au niveau cellulaire, en provoquant soit une inhibition apparente soit une luminescence accrue (22). Ainsi, il a été signalé que des concentrations de phyto-œstrogènes supérieures à 1 μM interféraient avec les signaux de luminescence, dans d'autres essais avec gènes rapporteurs faisant intervenir la luciférase, du fait d'une suractivation du gène rapporteur de la luciférase (23). Il convient donc d'examiner

▼M7

attentivement l'expression de la luciférase obtenue à des concentrations élevées de phyto-œstrogènes ou de produits chimiques similaires suspectés d'induire une suractivation du gène rapporteur de la luciférase comparable à celle résultant des phyto-œstrogènes (23). Dans les cas où l'on peut apporter la preuve que la méthode d'essai ne peut s'appliquer à d'autres catégories spécifiques de produits chimiques d'essai, il convient de ne pas utiliser cette méthode pour tester les catégories en question.

Outre qu'elle aide à distinguer les sensibilisants cutanés et des non-sensibilisants, la méthode KeratinoSens™ fournit sur la relation concentration-réponse des informations susceptibles de contribuer à l'évaluation de la puissance de sensibilisation, dans le cadre d'une approche intégrée IATA (19). Cependant, une étude complémentaire s'appuyant de préférence sur des données humaines fiables sera nécessaire pour déterminer de quelle façon les résultats de l'essai KeratinoSens™ peuvent contribuer à l'évaluation de la puissance (24) et à la sous-catégorisation des sensibilisants selon le SGH/CLP.

PRINCIPE DE L'ESSAI

La méthode d'essai ARE-Nrf2 luciférase utilise une lignée de cellules adhérentes immortalisées dérivées de kératinocytes humains HaCaT transfectés de façon stable avec un plasmide sélectionnable. Cette lignée cellulaire contient le gène de la luciférase sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur constitutif fusionné à un élément ARE d'un gène connu pour l'intensification de son expression sous l'effet de sensibilisants cutanés (25) (26). Le signal de la luciférase reflète l'activation par les sensibilisants de gènes endogènes dépendants du facteur Nrf2, et la dépendance du signal de la luciférase vis-à-vis de Nrf2 dans la lignée cellulaire recombinante a été démontrée (27). Cela permet la mesure quantitative (par détection de luminescence) de l'induction du gène de la luciférase, grâce à l'utilisation de substrats de luciférase produisant une luminescence satisfaisante, comme indicateur de l'activité du facteur de transcription Nrf2 dans les cellules après exposition à des substances électrophiles.

Dans l'essai KeratinoSens™, les produits chimiques d'essai sont considérés comme positifs s'ils provoquent une induction statistiquement significative de l'activité de la luciférase dépassant un seuil donné (c.à.d. supérieure à 1,5 fois, soit 50 % d'augmentation, dans la méthode KeratinoSens™), au-dessous d'une concentration donnée n'affectant pas significativement la viabilité de la cellule (au-dessous de 1 000 μM, par exemple, et à une concentration pour laquelle la viabilité cellulaire est supérieure à 70 % dans la méthode KeratinoSens™ (9) (12)). On établit à cet effet le facteur maximal (I_{max}) par lequel est multipliée l'induction de l'activité de la luciférase par rapport au témoin (négatif) de solvant. De plus, les cellules étant exposées à une série de concentrations du produit chimique d'essai, la concentration nécessaire pour obtenir une induction statistiquement significative de l'activité de la luciférase au-delà du seuil (c.à.d. la valeur $CE_{1,5}$ dans le cas de la méthode KeratinoSens™) devra être interpolée à partir de la courbe dose-réponse (voir paragraphe 32 pour la méthode de calcul). Enfin, des mesures de cytotoxicité devront être réalisées en parallèle pour déterminer si l'induction de l'activité de la liuciférase survient à des concentrations sub-cytotoxiques.

Avant d'utiliser en routine l'essai ARE-Nrf2 luciférase conformément à la présente méthode d'essai, les laboratoires devront faire la preuve de leurs compétences techniques, en appliquant la méthode aux dix substances énumérées à l'appendice 2.

Des normes de performance (28) ont été établies pour faciliter la validation de méthodes d'essai ARE-Nrf2 luciférase *in vitro* nouvelles ou modifiées similaires à l'essai KeratinoSens™, et permettre de modifier rapidement la présente méthode d'essai afin de les y intégrer. L'acceptation mutuelle des données conformément à l'accord de l'OCDE ne sera garantie pour les méthodes d'essai validées conformément aux normes de performance que si ces méthodes d'essai ont été examinées et incorporées dans la ligne directrice correspondante par l'OCDE.

▼M7

MODE OPÉRATOIRE

La seule méthode actuellement couverte par la présente méthode d'essai est l'essai scientifiquement validé KeratinoSens™ (9) (12) (13) (14). Les modes opératoires normalisés pour l'essai KeratinoSens™ sont disponibles et il convient de les appliquer lors de la mise en œuvre et de l'utilisation de cette méthode d'essai au laboratoire (15). Les laboratoires souhaitant appliquer cette méthode d'essai peuvent obtenir la lignée cellulaire recombinante utilisée dans l'essai KeratinoSens™ en établissant un accord de licence avec le développeur de la méthode. On trouvera dans les paragraphes qui suivent une description des principaux éléments et modes opératoires de la méthode d'essai ARE-Nrf2 luciférase.

Préparation des cultures de kératinocytes

Il convient d'utiliser une lignée de cellules transgéniques comportant une insertion stable du gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle de l'élément ARE (lignée cellulaire KeratinoSens™). A réception, les cellules sont multipliées (2 à 4 repiquages, par exemple) afin de former un stock homogène conservé à l'état congelé. Les cellules provenant de ce stock d'origine peuvent être multipliées jusqu'à un nombre maximum de repiquages (25, dans la méthode KeratinoSens™) et peuvent ensuite être employées pour des essais de routine moyennant l'utilisation d'un milieu d'entretien approprié (DMEM additionné de sérum et de généticine, dans la méthode KeratinoSens™).

Pour les essais, les cellules doivent présenter une confluence de 80-90 %, et il convient de veiller à ce qu'elles n'arrivent jamais à confluence complète. Une journée avant l'essai, les cellules sont récoltées et réparties dans des plaques 96 puits (10 000 cellules/puits dans la méthode KeratinoSens™). On veillera à éviter la sédimentation des cellules durant l'ensemencement, afin d'assurer une distribution homogène du nombre de cellules entre les puits. Si ce n'est pas le cas, cette étape peut donner lieu à une forte variabilité entre puits. Pour chaque répétition, trois réplicats sont utilisés pour mesurer l'activité de la luciférase, et un réplicat parallèle est utilisé pour le test de viabilité cellulaire.

Préparation du produit chimique d'essai et des substances témoins

Le produit chimique d'essai et les substances témoins sont préparés le jour du test. Dans l'essai KeratinoSens™, les produits chimiques d'essai sont dissous dans le diméthyl sulfoxyde (DMSO) à la concentration finale souhaitée (200 mM, par exemple). Les solutions de DMSO peuvent être considérées comme auto-stérilisantes, si bien qu'il n'est pas nécessaire de procéder à une filtration stérile. Les produits chimiques d'essai qui ne sont pas solubles dans le DMSO sont dissous dans de l'eau stérile ou un milieu de culture, et les solutions sont stérilisées, par exemple par filtration. Pour un produit chimique d'essai n'ayant pas de masse moléculaire (MM) définie, une solution mère est préparée à une concentration par défaut (40 mg/ml ou 4 % (m/v) dans l'essai KeratinoSens™). Dans le cas où des solvants autres que le DMSO, l'eau ou le milieu de culture sont utilisés, une justification suffisamment scientifique devra être fournie.

A partir des solutions mères du produit chimique d'essai dans le DMSO, des dilutions en série sont préparées avec du DMSO pour obtenir 12 concentrations de référence du produit chimique à tester (de 0,098 à 200 mM dans l'essai KeratinoSens™). Si le produit chimique d'essai n'est pas soluble dans le DMSO, les dilutions permettant d'obtenir les concentrations de référence sont réalisées avec de l'eau stérile ou un milieu de culture stérile. Indépendamment du solvant utilisé, les concentrations de référence sont ensuite diluées 25 fois dans un milieu de culture contenant du sérum, et utilisées finalement pour le traitement après une nouvelle dilution d'un facteur 4, si bien que les concentrations finales du produit chimique d'essai vont de 0,98 à 2 000 μM, dans l'essai KeratinoSens™. Il est possible d'utiliser d'autres concentrations si cela est justifié (dans le cas d'un produit cytotoxique ou peu soluble, par exemple).

Le témoin (de solvant) négatif utilisé dans l'essai KeratinoSens™ est le DMSO (n°CAS 67-68-5, pureté ≥99 %), pour lequel six puits sont préparés par plaque. Il est soumis à une dilution identique à celle décrite au paragraphe 22 pour les concentrations de référence, de telle sorte que la concentration finale du témoin (de solvant) négatif est de 1 %, connue pour ne pas affecter la viabilité cellulaire

▼M7

(soit la même concentration de DMSO que dans le produit chimique testé et dans le témoin positif). Si le produit chimique d'essai n'est pas soluble dans le DMSO et a été dilué dans l'eau, la concentration de DMSO dans tous les puits de la solution d'essai finale doit être ajustée à 1 %, comme pour les autres produits chimiques d'essai et substances témoins.

Le témoin positif utilisé dans l'essai KeratinoSens™ est l'aldéhyde cinnamique (n°CAS 14371-10-9, pureté ≥98 %), pour lequel une série de 5 concentrations de référence allant de 0,4 à 6,4 mM sont préparées dans le DMSO (à partir d'une solution mère à 6.4 mM) et diluées selon la procédure décrite au paragraphe 22 pour les concentrations de référence, si bien que la concentration finale du témoin positif se situe entre 4 et 64 μM. D'autres témoins positifs adaptés, donnant de préférence une $CE_{1,5}$ située dans la fourchette des valeurs moyennes, peuvent être utilisés si des données historiques sont disponibles pour dériver des critères d'acceptation issus de procédures comparables.

Application du produit chimique d'essai et des substances témoins

Pour chaque produit chimique d'essai et substance témoin positive, une expérience est nécessaire pour dériver une prédiction (positive ou négative), comportant au minimum deux répétitions indépendantes portant chacune sur trois réplicats (soit n = 6). En cas de résultats discordants entre les deux répétitions indépendantes, une troisième répétition portant sur trois réplicats (soit n = 9) devra être effectuée. Chaque répétition indépendante est effectuée à un jour différent au moyen d'une solution-mère de produit chimique d'essai, et de cellules collectées de façon indépendante. Les cellules peuvent cependant être issues du même repiquage.

Après ensemencement selon le mode opératoire décrit au paragraphe 20, les cellules sont mises en culture pendant 24 heures dans les plaques de microtitrage 96 puits. Le milieu est ensuite retiré et remplacé par du milieu de culture frais (150 μl de milieu de culture contenant du sérum mais dépourvu de généticine dans l'essai KeratinoSens™) additionné de 50 μl du produit chimique d'essai et des substances témoins dilués 25 fois. Au moins un puits par plaque doit être laissé vide (sans cellules ni traitement) afin de déterminer les valeurs de fond.

Les plaques traitées sont ensuite mises en incubation pendant environ 48 heures à 37°C ± 1°C sous 5 % de CO_2 dans l'essai KeratinoSens™. Il convient d'éviter l'évaporation des produits chimiques d'essai volatils, ainsi que les contaminations croisées entre puits par les produits chimiques d'essai, en couvrant par exemple les plaques d'une feuille protectrice avant l'incubation avec les produits chimiques d'essai.

Mesure de l'activité de la luciférase

Trois facteurs sont déterminants pour une lecture correcte de la luminescence:

— le choix d'un luminomètre sensible,

— l'utilisation d'un format de plaques de hauteur suffisante pour éviter une contamination croisée par la lumière, et

— l'utilisation d'un substrat de luciférase émettant suffisamment de lumière pour assurer une sensibilité satisfaisante et une faible variabilité.

Avant l'essai, un test sera réalisé selon le mode opératoire décrit à l'appendice 3 afin de vérifier que ces trois exigences sont remplies.

Après 48 heures d'exposition au produit chimique d'essai et aux substances témoins dans l'essai KeratinoSens™, les cellules sont lavées avec une solution physiologique tamponnée au phosphate, et le tampon de lyse approprié pour la lecture de la luminescence est ajouté à chaque puits pour une durée de 20 minutes à température ambiante.

▼M7

Les plaques contenant le lysat cellulaire sont ensuite placées pour lecture dans le luminomètre qui est programmé, dans l'essai KeratinoSens™, pour: (i) ajouter dans chaque puits le substrat de luciférase (50 µl), (ii) attendre une seconde, puis (iii) intégrer l'activité de la luciférase pendant 2 secondes. Si des paramètres différents sont utilisés compte tenu, par exemple, du modèle de luminomètre utilisé, il convient de les justifier. De plus, un substrat rayonnant peut également être utilisé, dans la mesure ou le contrôle de la qualité de l'expérience remplit les critères décrits à l'Appendice 3.

Évaluation de la cytotoxicité

Pour le test de viabilité cellulaire KeratinoSens™, le milieu est remplacé, après les 48 heures d'exposition, par du milieu frais contenant du MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, bromure de thiazolyl tetrazolium bleu; n°CAS 298-93-1) et les cellules sont mises en incubation pendant 4 heures à 37°C sous 5 % de CO_2. Le milieu contenant du MTT est alors retiré et les cellules sont lysées pendant la nuit (p.ex. par ajout de solution SDS à 10 % dans chaque puits). Après agitation, l'absorption est mesurée à 600 nm au photomètre.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation des données

Les paramètres suivants sont calculés dans l'essai KeratinoSens™:

— valeur maximale moyenne de l'induction de l'activité de la luciférase (I_{max}), pour chaque concentration du produit chimique d'essai et du témoin positif;

— valeur de $CE_{1,5}$, représentant la concentration pour laquelle une induction de l'activité de la luciférase est supérieure au seuil de 1,5 fois (soit une activité augmentée de 50 %) a été obtenue; et

— concentrations CI_{50} et CI_{30} correspondant à une réduction de 50 % et 30 % de la viabilité cellulaire.

— L'équation 1 permet de calculer le facteur multiplicatif de l'induction de l'activité de la luciférase, et la valeur résultante maximale de l'induction (I_{max}) est la moyenne de chacune des répétitions.

Équation 1:

$$Facteur\ multiplicatif\ de\ l'\ induction = \frac{(L_{echantillon} - L_{blanc})}{(L_{solvant} - L_{blanc})}$$

où

$L_{échantillon}$ est la luminescence mesurée dans le puits contenant le produit chimique d'essai

L_{blanc} est la luminescence mesurée dans le puits ne contenant ni cellules ni traitement

$L_{solvent}$ est la valeur moyenne de la luminescence mesurée dans les puits contenant des cellules et le témoin de solvant (négatif)

$CE_{1,5}$ est calculée par interpolation linéaire d'après l'équation 2, et la valeur résultante de l' $CE_{1.5}$ est la moyenne géométrique de chacune des répétitions.

Équation 2:

$$CE1{,}5 = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1{,}5 - I_\alpha}{I_b - I_\alpha}\right) + C_\alpha$$

▼M7

où

C_a est la concentration la plus faible, en µM, provoquant une augmentation de l'induction > 1,5 fois

C_b est la concentration la plus forte, en µM, provoquant une augmentation de l'induction < 1,5 fois

I_a est la multiplication de l'induction mesurée à la concentration la plus faible donnant une augmentation de l'induction > 1,5 fois (moyenne de trois puits réplicats)

I_b est la multiplication de l'induction mesurée à la concentration la plus forte donnant une augmentation de l'induction < 1,5 fois (moyenne de trois puits réplicats)

L'équation 3 permet de calculer la viabilité:

Équation 3:

$$Viabilité = \frac{(V_{échantillon} - V_{blanc})}{V_{solvant} - V_{blanc}} \times 100$$

où

$V_{échantillon}$ est l'absorbance mesurée lors du test au MTT dans le puits contenant le produit chimique d'essai

V_{blanc} est l'absorbance mesurée lors du test au MTT dans le puits ne contenant ni cellules ni traitement

$V_{solvant}$ est la valeur moyenne de l'absorbance mesurée lors du test au MTT dans les puits contenant des cellules et le témoin de solvant (négatif)

CI_{50} et CI_{30} sont calculés par interpolation linéaire d'après l'équation 4, et les valeurs résultantes de CI_{50} et CI_{30} sont les moyennes géométriques de chacune des répétitions.

Équation 4:

$$CI_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100 - x) - V_a}{V_b - V_a}\right) + C_a$$

où

X est la réduction en % à la concentration qui doit être établie par calcul (50 et 30 pour CI_{50} et CI_{30})

C_a est la concentration la plus faible en µM pour laquelle la réduction de viabilité est > x %

C_b est la concentration la plus forte en µM pour laquelle la réduction de viabilité est < x %

V_a est la viabilité en % à la concentration la plus faible pour laquelle la réduction de viabilité est > x %

V_b est la viabilité en % à la concentration la plus forte pour laquelle la réduction de viabilité est < x %

Pour chaque concentration donnant une augmentation de l'induction de l'activité de la luciférase > 1,5 fois, on calcule la signification statistique (par un test t de Student bilatéral, par exemple) en comparant la luminescence pour les trois échantillons réplicats avec la luminescence pour les puits contenant le témoin de solvant (négatif), afin de déterminer si l'induction de l'activité de la luciférase est statistiquement significative ($p < 0,05$). La concentration la plus faible pour laquelle l'augmentation de l'induction de l'activité de la luciférase est > 1,5 fois est la valeur déterminant $CE_{1,5}$. On vérifie dans chaque cas si cette valeur est inférieure à CI_{30}, et donc si la réduction de la viabilité cellulaire est bien inférieure à 30 % à la concentration déterminant $CE_{1,5}$.

▼M7

Il est recommandé de vérifier visuellement les données à l'aide de graphiques. En l'absence de courbe dose-réponse clairement observable, ou si la courbe dose-réponse obtenue est biphasique (c'est-à-dire qu'elle croise deux fois le seuil de 1,5), il convient de répéter l'expérience pour vérifier si ce résultat est spécifique au produit chimique d'essai ou s'il s'agit d'un artefact expérimental. Dans le cas où la réponse biphasique est reproductible au cours d'un essai indépendant, c'est la valeur $CE_{1,5}$ la plus basse (la concentration à laquelle la courbe croise le seuil de 1,5 pour la première fois) qui doit être consignée dans le rapport.

Dans les rares cas où l'on observe une induction statistiquement non significative supérieure à 1,5 fois, suivie d'une induction statistiquement significative à une concentration plus élevée, les résultats de cette répétition ne sont considérés comme valides et positifs que si une induction statistiquement significative supérieure au seuil de 1,5 a été obtenue à une concentration non cytotoxique.

Enfin, pour les produits chimiques d'essai générant une augmentation de l'induction égale ou supérieure à 1,5 fois pour la concentration testée la plus faible de 0,98 μM, la valeur de $CE_{1,5}$ est fixée à < 0,98 sur la base d'un examen visuel de la courbe dose-réponse.

Critères d'acceptabilité

Les critères d'acceptabilité suivants doivent être remplis lors de la mise en œuvre de l'essai KeratinoSens™. Premièrement, l'induction de l'activité de la luciférase obtenue avec le témoin positif (aldéhyde cinnamique) doit être significativement supérieure au seuil de 1,5 (d'après un test T, par exemple) pour au moins l'une des concentrations testées (de 4 à 64 μM).

Deuxièmement, la valeur de $CE_{1,5}$ doit se situer dans un intervalle de deux écarts types autour de la moyenne historique du laboratoire (entre 7 μM et 30 μM, par exemple, d'après les données utilisées pour la validation), qui devra être actualisée régulièrement. De plus, l'induction moyenne des trois réplicats pour l'aldéhyde cinnamique à 64 μM doit se situer entre 2 et 8. Si ce dernier critère n'est pas rempli, la relation dose-réponse pour l'aldéhyde cinnamique devra être vérifiée avec soin, et les tests ne pourront être acceptés que s'il existe une relation dose-réponse claire, l'induction de l'activité de la luciférase augmentant avec la concentration pour le témoin positif.

Enfin, le coefficient moyen de variation de la luminescence pour le témoin (de solvant) négatif DMSO doit être inférieur à 20 % pour chaque répétition qui comprend 6 puits testés en triplicats. Si la variabilité est supérieure, les résultats ne doivent pas être pris en compte.

Interprétation des résultats et modèle prédictif

Une prédiction KeratinoSens™ est considérée comme positive si les 4 conditions suivantes sont remplies lors de 2 répétitions sur 2 ou sur 3; dans le cas contraire, la prédiction KeratinoSens™ est considérée comme négative (figure 1):

1. I_{max} est supérieur à (>) 1,5 fois et supérieur de façon statistiquement significative à la valeur obtenue pour le témoin (négatif) de solvant (tel qu'il a été déterminé par un test t de Student bilatéral non-apparié);

2. la viabilité cellulaire est supérieure à (>) 70 % à la concentration la plus faible pour laquelle l'augmentation de l'induction de l'activité de la luciférase est supérieure à 1,5 fois (c'est-à-dire à la concentration déterminant $CE_{1,5}$);

3. la valeur de $CE_{1.5}$ est inférieure à (<) 1 000 μM (ou < 200 μg/ml pour les produits chimiques d'essai n'ayant pas de masse moléculaire définie);

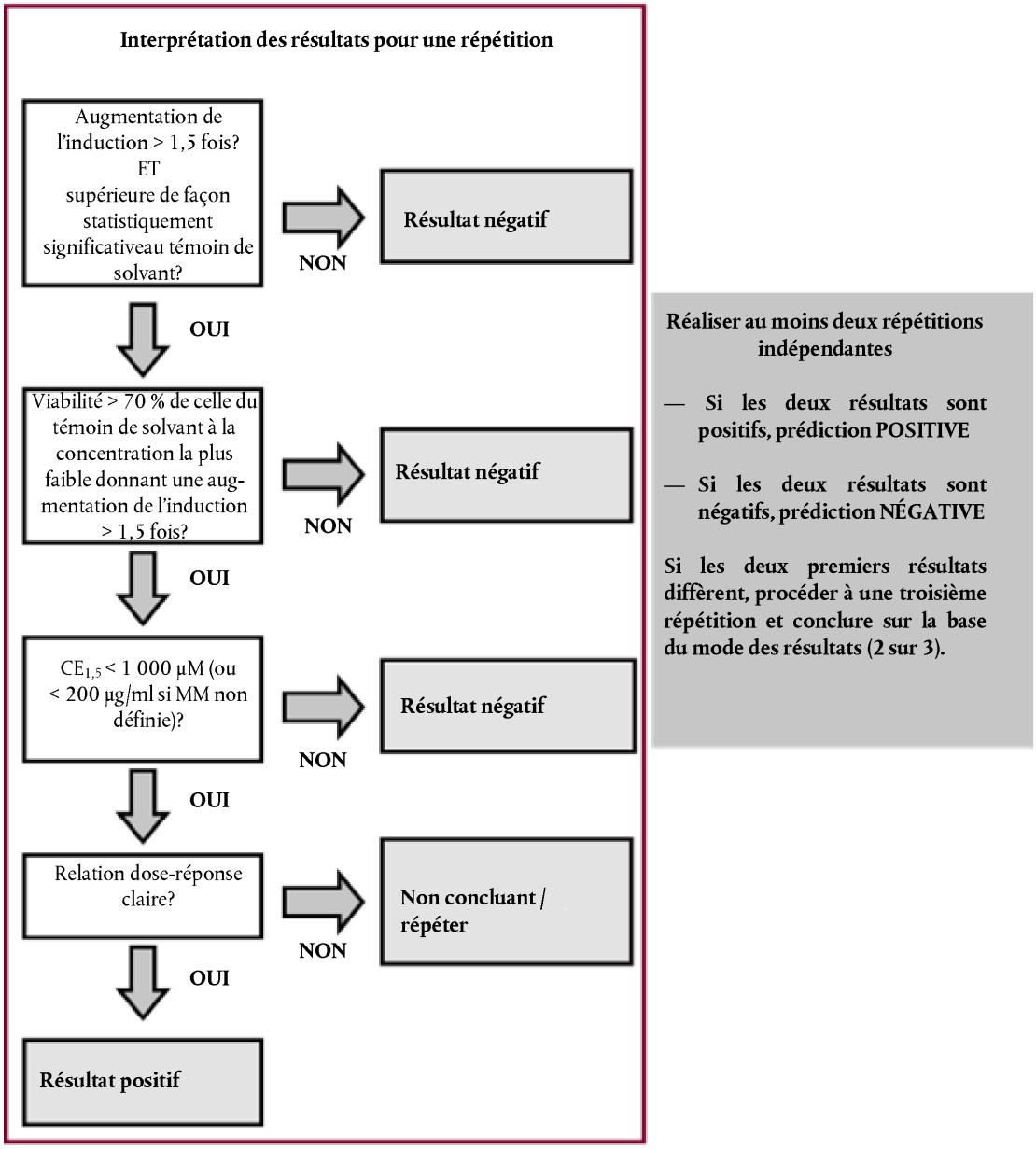
4. on observe globalement une relation dose-réponse claire pour l'induction de la luciférase (ou une réponse bi-phasique, comme indiqué au paragraphe 33).

▼M7

Si, lors d'une répétition donnée, les trois premières conditions sont remplies mais qu'il n'y a pas de relation dose-réponse clairement observable pour l'induction de la luciférase, le résultat de cette répétition doit être considéré comme non concluant et des tests supplémentaires peuvent être requis (figure 1). En outre, un résultat négatif obtenu avec des concentrations < 1 000 µM (ou <200 µg/ml pour les produits chimiques dont le poids moléculaire n'est pas défini) sera également considéré comme non concluant (voir le paragraphe 11).

Figure 1

Modèle prédictif utilisé dans l'essai KeratinoSens™. Une prédiction KeratinoSens™ doit être envisagée dans le cadre d'une démarche IATA et conformément aux dispositions des paragraphes 9 et 11.



Dans de rares cas, les produits chimiques d'essai qui induisent une activité de la luciférase à des niveaux très proches des concentrations cytotoxiques peuvent être positifs à des concentrations non cytotoxiques (c.à.d. $EC_{1,5}$ déterminant la concentration en-dessous (<) de l'IC_{30}), et dans d'autres répétitions, uniquement à des concentrations cytotoxiques (c.à.d. $EC_{1,5}$ déterminant la concentration en-dessus (>) de l'IC_{30}). Ces produits seront re-testés en procédant à une analyse

▼M7

dose-réponse plus serrée, avec un facteur de dilution plus bas (par exemple, 1,33 ou √2 (=1,41) fois entre puits), afin de déterminer si l'induction s'est produite à des niveaux cytotoxiques ou non (9).

Rapport d'essai

Le rapport d'essai devra comporter les informations suivantes:

Produit chimique d'essai

— Substance mono-constituant

  — Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants;

  — Apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;

  — Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;

  — Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);

  — Concentration(s) testée(s);

  — Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

— Substance multi-constituants, UVCB ou mélange:

  — Caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;

  — Apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;

  — Masse moléculaire ou masse moléculaire apparente dans le cas de mélanges/polymères de composition connue ou autres informations pertinentes pour la conduite de l'étude;

  — Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);

  — Concentration(s) testée(s);

  — Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Témoins

— Témoin positif

  — Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants;

  — Apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;

  — Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;

  — Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);

  — Concentration(s) testée(s);

  — Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;

▼M7

— Référence aux données historiques relatives aux témoins positifs démontrant la conformité aux critères d'acceptabilité, s'il y a lieu.

— Témoin (véhicule) négatif

— Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS et/ou autres identifiants;

— Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;

— Apparence physique, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, si des témoins négatifs / véhicules autres que ceux mentionnés dans la méthode d'essai sont utilisés, et selon les données disponibles;

— Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;

— Justification du choix du solvant pour chaque produit chimique d'essai.

Conditions d'application de la méthode d'essai

— Nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude;

— Description de la méthode d'essai utilisée;

— Lignée cellulaire utilisée, conditions de stockage et source (établissement d'où proviennent les cellules, par exemple);

— Nombre de repiquages et niveau de confluence des cellules utilisées pour l'essai;

— Méthode de comptage des cellules utilisée pour l'ensemencement avant l'essai, et mesures prises pour assurer une répartition quantitative homogène des cellules (cf. paragraphe 18);

— Luminomètre utilisé (modèle, par exemple), en particulier paramétrage des instruments, substrat de luciférase utilisé, et démonstration de la qualité des mesures de luminescence, d'après le test décrit à l'appendice 3;

— Procédure appliquée pour démontrer les compétences du laboratoire dans l'application de la méthode d'essai (p. ex. au moyen des substances d'épreuve de compétence) ou pour démontrer la reproductibilité de cette application dans le temps.

Mode opératoire

— Nombre de répétitions et de réplicats utilisés;

— Concentration de produit chimique d'essai, procédure d'application et moment d'exposition (si différent du moment recommandé)

— Description des critères d'évaluation et de décision appliqués;

— Description des critères d'acceptabilité de l'étude appliqués;

— Description de toutes modifications apportées au mode opératoire.

Résultats

— Tableau des valeurs obtenues pour I_{max}, $CE_{1,5}$ (c.à.d. IC_{50} et IC_{30}) et la viabilité, pour le produit chimique d'essai et pour le témoin positif dans chaque répétition, ainsi que des valeurs moyennes (I_{max}: moyenne arithmétique; $CE_{1,5}$ et viabilité: moyenne géométrique) et des écarts-types calculés en utilisant les données de chaque répétition, et indication du classement du produit chimique d'essai selon le modèle prédictif;

▼M7

— Coefficient de variation des données de luminescence obtenu dans chaque expérience pour le témoin négatif;

— Graphique représentant les courbes dose-réponse pour l'induction de l'activité de la luciférase et la viabilité;

— Description de toutes autres observations pertinentes, s'il y a lieu.

Discussion des résultats

— Discussion des résultats obtenus par l'essai KeratinoSens™;

— Examen des résultats de la méthode d'essai dans le contexte d'une démarche intégrée (IATA), si d'autres informations pertinentes sont disponibles.

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

(1) Nations Unies (ONU) (2013). Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH), 5e édition révisée, Nations Unies New York et Genève, 2013. Disponible à l'adresse suivante: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, no 168. OCDE, Paris

(3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85, 367-485.

(4) Chapitre B.42 de la présente annexe: Sensibilisation cutanée: essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques.

(5) Chapitre B.6 de la présente annexe: Sensibilisation cutanée.

(6) Chapitre B.50 de la présente annexe: Sensibilisation cutanée: essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques: DA.

(7) Chapitre B.51 de la présente annexe: Sensibilisation cutanée: essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques: BrdU-ELISA.

(8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. Toxicological Sciences 113, 284-292.

(9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology 245, 281-290.

(10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. Chem. Res. Toxicol. 18, 1779-1791.

▼M7

(11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. 1(1), 45-49.

(12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. Toxicol. *In Vitro* 25, 733-744.

(13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, 33, 1337-1352.

(14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Disponible à l'adresse suivante: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.

(15) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™., 17 pp. Disponible à l'adresse suivante: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index

(16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. Toxicol. Sci. 107, 106-121.

(17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regul. Toxicol. Pharmacol. 60, 389-400.

(18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. Regul. Toxicol. Pharmacol. 63, 489-504.

(19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. J Appl Toxicol. 33, 1353-1364.

(20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. Toxicology *In Vitro* 27, 1220-1225.

(21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch. Toxicol. 87, 1683-1969.

(22) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. Chemistry and Biology 17, 646-657.

(23) OCDE (2012). Essai de transactivation faisant appel au récepteur des œstrogènes BG1Luc pour identifier les agonistes ou antagonistes des récepteurs des œstrogènes. Ligne directrice 457 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. OCDE, Paris.

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

(25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. J. Invest. Dermatol., 126, 1813-1822.

▼**M7**

(26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. Toxicol. Lett. 150, 301-316.

(27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. Toxicol. *in vitro* 27, 2225-2232.

(28) OCDE (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Série sur les essais et les évaluations n° 213. OCDE, Paris.

(29) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 34. OCDE, Paris, France.

(30) NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides — (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 pp. http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf

▼**M7**

Appendice 1

DÉFINITIONS

AOP (Adverse Outcome Pathway): séquence d'événements conduisant à la survenue d'un effet indésirable *in vivo*, à partir de la structure chimique d'un produit chimique cible ou d'un groupe de produits chimiques similaires et de l'événement initiateur au niveau moléculaire (2).

ARE: L'élément de réponse antioxydant (aussi appelé EpRE, élément de réponse électrophile) est un élément de réponse présent dans la région promotrice amont de nombreux gènes cytoprotecteurs et gènes de phase II. Lorsqu'il est activé par le facteur Nfr2, il médie l'induction transcriptionnelle de ces gènes.

Coefficient de variation: la mesure de la variabilité calculée pour un groupe de données issues de réplicats en divisant la déviation standard par la moyenne. Cette mesure peut être multipliée par 100 pour obtenir un pourcentage.

Danger: Propriété inhérente d'un agent ou d'une situation susceptible de provoquer des effets indésirables lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-) population est exposé(e) à cet agent.

$EC_{1,5}$: Concentration, établie par interpolation, à laquelle l'induction de luciférase est multipliée par 1.5.

Fiabilité: Indique dans quelle mesure la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au cours du temps par un même laboratoire ou plusieurs laboratoires utilisant le même mode opératoire. Pour l'évaluer, on calcule la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires et la répétabilité intra-laboratoire (29).

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): Approche structurée utilisée dans l'identification du danger (potentiel), la caractérisation du danger (puissance) et/ou dans l'évaluation'de la sécurité (potentiel de danger/puissance du danger et exposition) d'un produit chimique ou d'un groupe de produits chimiques, qui intègre de façon stratégique et pondérée toutes les données pertinentes dans le but d'informer une décision réglementaire sur le danger potentiel et/ou le risque et/ou le besoin d'effectuer d'autres tests ciblés.

IC_{30}: Concentration pour laquelle la viabilité cellulaire, établie par le test au MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, bromure de thiazolyl tetrazolium bleu; n°CAS 298-93-1), est réduite de 30 %.

IC_{50}: Concentration pour laquelle la viabilité cellulaire, établie par le test au MTT, est réduite de 50 %.

I_{max}: Facteur d'induction maximale de l'activité de la luciférase, à quelque concentration du produit chimique d'essai, comparé au témoin (négatif) de solvant.

Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1, est une protéine détectrice pouvant réguler l'activité du facteur Nrf2. En conditions non induites, la protéine détectrice Keap1 cible le facteur de transcription Nrf2 et provoque son ubiquitination et sa dégradation protéolytique dans le protéasome. En cas de modification covalente des résidus cystéine réactifs de Keap1 par des molécules de petite taille, Nrf2 peut se dissocier de Keap1 (8) (10) (11).

▼M7

Mélange: Mélange ou solution constitué(e) d'au moins deux substances qui ne réagissent pas entre elles (1).

Méthode d'essai valide: Méthode d'essai dont la pertinence et la fiabilité sont jugées satisfaisantes pour des fins spécifiques, et qui repose sur des principes scientifiquement valables. Une méthode d'essai n'est jamais valide dans l'absolu, mais seulement par rapport à une fin particulière (29).

Nrf2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2, Facteur de transcription intervenant dans la voie de réponse antioxydante. Lorsque Nrf2 n'est pas ubiquitiné, il se développe dans le cytoplasme et se transloque dans le noyau, où il se combine à l'ARE dans la région promotrice amont de nombreux gènes cytoprotecteurs, dont il initie la transcription (8) (10) (11).

Pertinence: Décrit la relation entre l'essai et l'effet étudié, et rend compte de l'adéquation de l'essai et de son utilité à des fins spécifiques. La pertinence indique dans quelle mesure l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. Elle tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (29).

Précision: Étroitesse de l'accord entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa «pertinence». Ce terme est souvent utilisé au sens de «concordance», pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (29).

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique d'essai: Le terme «produit chimique d'essai» désigne ce qui est testé.

Reproductibilité: Accord entre les résultats obtenus lors d'essais pratiqués sur le même produit chimique selon le même mode opératoire (voir Fiabilité) (29).

Sensibilité: Proportion des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par la méthode d'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (29).

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations unies): Système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans l'objectif de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (1).

Spécificité: Proportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont correctement classés par la méthode d'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (29).

Substance: Élément chimique et ses composés, présents à l'état naturel ou obtenus grâce à un procédé de production. Ce terme inclut tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit ainsi que toute impureté produite par le procédé utilisé, mais exclut tout solvant pouvant être extrait sans affecter la stabilité ni modifier la composition de la substance (1).

Substance mono-constituant: Substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un constituant principal est présent à hauteur de 80 % minimum (m/m).

▼**M7**

Substance multi-constituants: Substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant principal est présent dans une concentration ≥ 10 % (m/m) et < 80 % (m/m). Une substance multi-constituants résulte d'un processus de fabrication. La différence entre un mélange et une substance multi-constituants est qu'un mélange est obtenu en associant deux substances ou plus sans qu'il se produise de réaction chimique. Une substance multi-constituants est le résultat d'une réaction chimique.

Témoin de solvant/véhicule: Réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai, excepté le produit chimique d'essai, mais comprenant le solvant utilisé. Il sert à déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique d'essai dissous dans le même solvant ou véhicule.

UVCB: Substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques.

▼M7

Appendice 2

SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE

Sensibilisation cutanée *in vitro*: méthode d'essai ARE-Nrf2 luciférase

Avant d'utiliser en routine la présente méthode d'essai, les laboratoires doivent démontrer leurs compétences techniques en obtenant les prédictions attendues par la méthode KeratinoSens™ pour les 10 substances d'épreuve de compétence recommandées au tableau 1, et en obtenant des valeurs de $CE_{1,5}$ et CI_{50} se situant dans les domaines de référence respectifs de ces deux grandeurs pour au moins 8 des 10 substances d'épreuve de compétence. Ces substances ont été sélectionnées de façon à représenter la gamme des réponses possibles en ce qui concerne les dangers de sensibilisation cutanée. Les autres critères de sélection sont la disponibilité des substances dans le commerce, ainsi que la qualité élevée des données de référence *in vivo* disponibles et des données *in vitro* obtenues par l'essai KeratinoSens™.

Tableau 1

Substances recommandées pour démontrer les compétences techniques relatives à l'essai KeratinoSens™

Substances d'épreuve de compétence	N°CAS	État physique	Prédiction *in vivo* (1)	Prédiction Keratino-Sens™ (2)	$CE_{1,5}$ (µM) Domaine de référence (3)	CI_{50} (µM) Domaine de référence (3)
Isopropanol	67-63-0	Liquide	Non-sensibilisant	Négative	> 1 000	> 1 000
Acide salicylique	69-72-7	Solide	Non-sensibilisant	Négative	> 1 000	> 1 000
Acide lactique	50-21-5	Liquide	Non-sensibilisant	Négative	> 1 000	> 1 000
Glycérol	56-81-5	Liquide	Non-sensibilisant	Négative	> 1 000	> 1 000
Alcool cinnamylique	104-54-1	Solide	Sensibilisant (faible)	Positive	25 – 175	> 1 000
Diméthacrylate d'éthylene glycol	97-90-5	Liquide	Sensibilisant (faible)	Positive	5 – 125	> 500
2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	Solide	Sensibilisant (modéré)	Positive	25 – 250	> 500
Methyldibromo glutaronitrile	35691-65-7	Solide	Sensibilisant (fort)	Positive	< 20	20 – 100
4-Methylaminophenol sulfate	55-55-0	Solide	Sensibilisant (fort)	Positive	< 12.5	20 – 200
2,4-Dinitro-chlorobenzène	97-00-7	Solide	Sensibilisant (extrême)	Positive	< 12.5	5 – 20

(1) La prédiction des dangers *in vivo* (et la puissance) est fondée sur les données ELGL (13). La puissance in vivo est déterminé au moyen des critères proposé par ECETOC (24).

(2) Une prédiction KeratinoSens™ doit être envisagée dans le cadre d'une démarche de type IATA et conformément aux dispositions des paragraphes 9 et 11 de la présente méthode d'essai.

(3) D'après les données historiques observées (12).

▼M7

Appendice 3

CONTRÔLE QUALITÉ DES MESURES DE LUMINESCENCE

Expérience préliminaire visant à garantir des mesures de luminescence optimales lors de l'essai KeratinoSens™

Les trois paramètres suivants sont essentiels pour garantir l'obtention de résultats fiables au luminomètre:

— sensibilité suffisante assurant un niveau de fond stable dans les puits témoins;

— absence de gradient sur la plaque dû à des temps de lecture trop longs; et

— absence de contamination lumineuse des puits à forte activité vers les puits adjacents.

Avant de procéder à l'essai, il est recommandé de vérifier la qualité des mesures de luminescence en testant une plaque témoin organisée comme indiqué ci-après (analyse en triplicat).

Organisation de la plaque pour l'essai préliminaire

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	**DMAEG 0,98**	**DMAEG 1,95**	**DMAEG 3,9**	**DMAEG 7,8**	**DMAEG 15,6**	**DMAEG 31,25**	**DMAEG 62,5**	**DMAEG 125**	**DMAEG 250**	**DMAEG 500**	**DMAEG 1000**	**DMAEG 2000**
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	**AC 4**	**AC 8**	**AC 16**	**AC 32**	**AC 64**	**Vide**

DMAEG = diméthacrylate d'éthylène glycol (CAS No: 97-90-5), produit chimique provoquant une forte induction

AC = aldéhyde cinnamique, témoin positif (CAS No: 104-55-2)

L'analyse de contrôle qualité doit établir:

— une relation dose-réponse claire à la ligne D, avec un I_{max} > 20 fois le niveau de fond (dans la plupart des cas, I_{max} atteint des valeurs comprises entre 100 et 300);

— l'absence de relation dose-réponse aux lignes C et E (pas de valeur d'induction supérieure à 1.5 (idéalement 1.3) en raison d'une possible contamination lumineuse, particulièrement à proximité des puits fortement actifs de la ligne DMAEG);

— l'absence de différence statistiquement significative entre les lignes A, B, C, E, F et G (absence de gradient sur la plaque); et

— une variabilité dans les lignes A, B, C, E, F et G et les puits DMSO de la ligne H qui est inférieure à 20 % (niveau de fond stable).

▼M7

B.61. MÉTHODE D'ESSAI DE DIFFUSION DE FLUORESCÉINE POUR IDENTIFIER LES SUBSTANCES CORROSIVES ET FORTEMENT IRRITANTES POUR L'ŒIL

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 460 (2012) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La méthode d'essai de diffusion de fluorescéine (DF) est une méthode d'essai *in vitro* qui, dans certaines circonstances et assortie de restrictions spécifiques, peut être utilisée pour classer les produits chimiques (substances et mélanges) comme corrosifs et fortement irritants pour l'œil, au sens du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU) (catégorie 1), du règlement (CE) n° 1272/2008 de l'Union européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (CLP) ([1]) (catégorie 1), et de l'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (EPA) (catégorie I) (1) (2). Aux fins de la présente méthode d'essai, les substances fortement irritantes pour l'œil sont définies comme des produits chimiques provoquant des lésions des tissus oculaires après application sur l'œil, lésions qui ne sont pas réversibles dans les 21 jours suivant l'application ou qui entraînent une dégradation sévère de la vue, tandis que les substances corrosives pour l'œil occasionnent des lésions irréversibles des tissus oculaires. Ces substances sont classées dans la catégorie 1 du SGH (ONU), la catégorie 1 du CLP (UE) ou la catégorie I de l'EPA (États-Unis).

Bien que la méthode d'essai de DF n'ait pas été validée comme méthode substitutive complète à l'essai oculaire *in vivo* sur le lapin, elle est recommandée comme élément d'une stratégie d'essais à plusieurs niveaux à des fins de classification et d'étiquetage réglementaires. Le recours à la DF est en effet recommandé en phase initiale d'une approche «top-down» (descendante) pour identifier les substances corrosives et fortement irritantes pour l'œil, en particulier pour certains types de produits chimiques (substances et mélanges hydrosolubles) (3) (4).

Il est généralement admis que dans notre horizon de prévision, aucun essai unique d'irritation oculaire *in vitro* ne pourra remplacer le test *in vivo* [méthode d'essai B.5 (5)] pour établir le degré d'irritation provoqué par les différentes classes de produits chimiques. Cependant, la combinaison de plusieurs méthodes de substitution dans le cadre d'une stratégie d'essais (à plusieurs niveaux) pourrait remplacer le test *in vivo* (4). L'approche «top-down» (45) est indiquée lorsque, d'après les informations existantes, on s'attend à ce qu'un produit chimique soit fortement irritant.

Suivant le modèle prédictif détaillé au paragraphe 35, la méthode d'essai de DF permet, sans essai complémentaire, de classer les produits chimiques comme corrosifs ou fortement irritants pour l'œil dans un domaine d'applicabilité limité (catégorie 1 du SGH; catégorie 1 du CLP; catégorie I de l'EPA). On suppose que la méthode s'applique également aux mélanges bien qu'aucun mélange n'ait été utilisé pour la validation. La méthode d'essai de DF peut donc servir à identifier les substances chimiques irritantes/corrosives pour l'œil en suivant la stratégie d'essais séquentiels de la méthode d'essai B.5 (6). Toutefois, si un produit chimique n'est pas identifié comme corrosif ou fortement irritant pour l'œil à l'issue de l'essai de DF, il convient de le soumettre à une ou plusieurs autres méthodes d'essai (*in vitro* et/ou *in vivo*) capables d'identifier précisément i) les substances qui sont des faux négatifs pour les essais de DF *in vitro* visant à repérer les effets corrosifs/fortement irritants sur l'œil (catégorie 1 du SGH; catégorie 1 du CLP; catégorie I de l'EPA); ii) les substances non classées en ce qui concerne la corrosion/l'irritation oculaire (pas de catégorie dans le SGH;

([1]) Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006.

▼M7

pas de catégorie dans le CLP; catégorie IV de l'EPA); et/ou iii) les substances modérément à légèrement irritantes pour l'œil (catégories 2A et 2B du SGH; catégorie 2 du CLP; catégories II et III de l'EPA).

L'objet de la présente méthode d'essai est de décrire les procédures utilisées pour évaluer les éventuels effets corrosifs ou fortement irritants pour l'œil d'un produit chimique au regard de sa capacité d'induire des lésions sur une monocouche épithéliale confluente imperméable. L'intégrité de la perméabilité transépithéliale constitue une fonction primordiale d'un épithélium tel que celui présent dans la conjonctive et la cornée. La perméabilité transépithéliale est contrôlée par diverses jonctions serrées. Une corrélation a été démontrée entre l'augmentation de la perméabilité de l'épithélium cornéen *in vivo* et la sévérité de l'inflammation et des lésions de la surface de l'œil observées dans le développement d'une irritation oculaire.

La méthode d'essai de DF permet de mesurer les effets toxiques induits après un court temps d'exposition au produit chimique d'essai en déterminant l'augmentation de la perméabilité à la fluorescéine-sodium à travers une monocouche épithéliale de cellules rénales de chien Madin-Darby (MDCK) cultivées sur des inserts perméables. La quantité de fluorescéine qui se diffuse est proportionnelle aux lésions provoquées par le produit chimique sur les jonctions serrées, les desmosomes et les cellules membranaires, et permet ainsi d'estimer sa toxicité potentielle pour l'œil. L'appendice 1 contient un diagramme représentant les cellules MDCK cultivées sur la membrane d'un insert pour la méthode d'essai de DF.

Les définitions utilisées sont données à l'appendice 2.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

La méthode d'essai s'inspire du protocole INVITTOX n° 71 (6) qui a fait l'objet d'une évaluation dans le cadre d'une étude de validation internationale par le Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (ECVAM), en collaboration avec le Comité de coordination inter-agences pour la validation des méthodes alternatives (ICCVAM) des États-Unis et avec le Centre japonais pour la validation de méthodes alternatives (JaCVAM).

La méthode d'essai de DF n'est pas recommandée pour identifier les produits chimiques qui devraient être classés comme légèrement à modérément irritants, ou ceux qui ne devraient pas être classés comme irritants pour l'œil (substances et mélanges) (qui relèvent des catégories 2A/2B ou d'aucune catégorie dans le SGH; de la catégorie 2 ou d'aucune catégorie dans le CLP; des catégories II, III et IV de l'EPA), comme l'a démontré l'étude de validation (3) (7).

La méthode d'essai ne s'applique qu'aux produits chimiques (substances et mélanges) hydrosolubles. Elle permet généralement de prévoir avec précision l'effet potentiel fortement irritant pour l'œil de produits chimiques qui sont hydrosolubles et/ou dont l'effet toxique n'est pas modifié par la dilution (7). Dans les conditions expérimentales, un produit chimique sera considéré comme hydrosoluble s'il est soluble dans une solution saline équilibrée de Hanks (HBSS) stérile avec calcium (à 1,0 — 1,8 mM) et sans rouge phénol, à une concentration supérieure ou égale à 250 mg/ml (soit une dose au-dessus de la valeur seuil fixée à 100 mg/ml). Néanmoins, si la substance d'essai est soluble à une concentration inférieure à 100 mg/ml, mais induit déjà une DF de 20 % à cette concentration (donc si DF_{20} < 100 mg/ml), elle peut quand même être classée dans la catégorie 1 du SGH ou dans la catégorie I de l'EPA.

Les acides et bases forts, les fixateurs cellulaires et les substances très volatiles sont hors des limites d'application mises en évidence pour cette méthode d'essai. Ces produits chimiques participent en effet à des mécanismes qui ne sont pas mesurés par la méthode de DF, par exemple coagulation extensive, saponification ou réactions chimiques spécifiques. Les résultats obtenus avec les produits chimiques d'essai colorés et visqueux révèlent d'autres limites de la capacité de prévision de cette méthode (7). En effet, ces deux types de substances sont difficiles à éliminer de la monocouche après le court temps d'exposition, et il est suggéré que la qualité de prévision de la méthode d'essai pourrait être

▼M7

améliorée en augmentant le nombre d'étapes de lavage mises en œuvre. Par ailleurs, les produits chimiques solides en suspension dans un liquide ont tendance à précipiter, si bien qu'il peut être difficile de déterminer la concentration finale à laquelle sont exposées les cellules. Si l'on exclut de la base de données les produits chimiques relevant de ces classes chimiques et physiques, la précision de la méthode de DF au regard des systèmes de classification de l'UE, de l'EPA et de l'ONU se trouve considérablement améliorée (7).

Dans l'optique de la présente méthode d'essai (qui vise exclusivement à identifier les substances corrosives/fortement irritantes pour l'œil), les taux de faux négatifs (voir paragraphe 13) ne sont pas préoccupants car les produits chimiques concernés feront l'objet d'essais chez le lapin ou d'autres essais *in vitro* dûment validés, conformément aux exigences de la réglementation, selon une démarche expérimentale séquentielle fondée sur l'analyse du poids de la preuve (5) (voir également les paragraphes 3 et 4).

La méthode d'essai de DF révèle d'autres limites à l'examen des taux de faux négatifs et faux positifs. Quand l'essai de DF est mis en œuvre en phase initiale d'une approche «top-down» pour identifier les substances et mélanges hydrosolubles corrosifs/fortement irritants pour l'œil (catégorie 1 du SGH; catégorie 1 du CLP; catégorie I de l'EPA), le taux de faux positifs est situé entre 7 % (7/103; SGH et CLP) et 9 % (9/99; EPA) et celui de faux négatifs entre 54 % (15/28; EPA) et 56 % (27/48; SGH et CLP), par rapport aux résultats obtenus *in vivo*. Les groupes de produits chimiques induisant des faux positifs et/ou des faux négatifs avec la méthode d'essai de DF ne sont pas définis dans le présent document.

Certaines limites techniques sont propres à la culture de cellules MDCK. Les jonctions serrées qui bloquent le passage du colorant (fluorescéine-sodium) à travers la monocouche baissent en qualité avec l'augmentation du nombre de repiquages des cultures. Or, la formation incomplète des jonctions serrées débouche sur une hausse de la diffusion de fluorescéine dans le témoin non traité. Il importe donc de définir un niveau de diffusion maximal admissible dans les témoins non traités (voir paragraphe 38: diffusion de 0 %). Comme dans tous les essais *in vitro*, les cellules employées risquent de se transformer au fil du temps, c'est pourquoi il est crucial de préciser la fourchette du nombre de passages des essais.

Le domaine d'applicabilité actuel pourrait être étendu dans certains cas, mais seulement après analyse d'un ensemble élargi de données sur les produits chimiques testés, données obtenues de préférence lors d'essais (4). La présente méthode d'essai sera mise à jour en conséquence, après l'examen de nouvelles informations et données.

Tout laboratoire qui fait appel au présent essai pour la première fois doit recourir aux produits chimiques d'épreuve de compétence indiqués à l'appendice 3. Les laboratoires peuvent utiliser ces substances pour apporter la preuve de leur compétence technique au regard de la mise en œuvre de la méthode d'essai de DF avant de soumettre les résultats des essais de DF à des fins de classification réglementaire dans une catégorie de danger.

PRINCIPE DE L'ESSAI

La méthode d'essai de DF est un essai *in vitro* fondé sur des paramètres de cytotoxicité et de fonctionnement cellulaire, réalisé sur une monocouche confluente de cellules épithéliales tubulaires MDCK CB997 cultivées sur des inserts semi-perméables et qui modélisent l'état non proliférant de l'épithélium cornéen *in vivo*. La lignée cellulaire MDCK est bien établie et forme des jonctions serrées et des desmosomes similaires à ceux que l'on observe sur la face apicale des épithéliums conjonctif et cornéen. *In vivo*, les jonctions serrées et les desmosomes empêchent les solutés et les substances exogènes de pénétrer l'épithélium cornéen. La perte d'imperméabilité transépithéliale, qui résulte de lésions des jonctions serrées et des desmosomes, est l'un des effets précoces de l'irritation oculaire d'origine chimique.

▼M7

Le produit chimique d'essai est appliqué sur la couche confluente de cellules cultivées sur la face apicale de l'insert. Un temps d'exposition réduit, de 1 min, est généralement appliqué pour refléter la vitesse de clairance normalement associée aux expositions humaines. L'un des avantages d'une courte durée d'exposition est que les substances et mélanges aqueux peuvent être évalués purs, s'il est possible de les éliminer facilement à l'issue du temps d'exposition. Cette possibilité permet d'effectuer des comparaisons plus directes avec les effets chimiques chez l'être humain. Le produit chimique d'essai est ensuite éliminé et la fluorescéine-sodium, un colorant non toxique et très fluorescent, est ajoutée sur la face apicale de la monocouche pendant 30 minutes. Les lésions induites par le produit chimique d'essai sur les jonctions serrées sont déterminées par la quantité de fluorescéine qui diffuse à travers la couche cellulaire pendant une durée définie.

La quantité de colorant (fluorescéine-sodium) qui a traversé la monocouche puis la membrane de l'insert et se retrouve dans un volume donné de solution du puits (où diffuse le colorant) est déterminée par mesure spectrofluorimétrique de la concentration de fluorescéine dans le puits. L'ampleur de la diffusion de fluorescéine (DF) est calculée par rapport aux intensités de fluorescence (IF) relevées pour deux témoins: un témoin à blanc et un témoin de la diffusion maximale. Le pourcentage de diffusion, et donc l'ampleur des lésions des jonctions serrées, est exprimé, par rapport à ces deux témoins, pour chacune des concentrations du produit chimique d'essai. On calcule alors la DF20 (c'est-à-dire la concentration provoquant une DF égale à 20 % de la valeur relevée pour la monocouche confluente non exposée et les inserts sans cellules). La valeur de la DF_{20} (mg/ml) est alors utilisée dans le modèle de prévision pour identifier les produits chimiques corrosifs et fortement irritants pour l'œil (voir paragraphe 35).

La capacité de récupération constitue un aspect important du profil toxicologique d'un produit chimique d'essai, également évaluée dans l'essai d'irritation oculaire *in vivo*. Des analyses préliminaires indiquent que les données sur la récupération (jusqu'à 72 h après l'exposition chimique) sont susceptibles d'améliorer la capacité de prévision du protocole INVITTOX 71, mais d'autres évaluations s'imposent et nécessitent des données supplémentaires, obtenues de préférence lors d'essais complémentaires (6). La présente méthode d'essai sera mise à jour en conséquence, après l'examen de nouvelles informations et données.

MODE OPÉRATOIRE

Préparation de la monocouche cellulaire

La monocouche de cellules MDCK CB997 est préparée avec des cellules sub-confluentes cultivées en fioles dans le milieu de Eagle modifié de Dulbecco/mélange nutritif F12 (concentré x 1 avec L-glutamine, HEPES à 15 mM, calcium à 1,0 — 1,8 mM, et 10 % de SVF/SBF désactivé à chaud). Il importe que tous les milieux et solutions employés au cours de l'essai de DF contiennent du calcium à une concentration située entre 1,0 mM (111 mg/l) et 1,8 mM (200 mg/l), pour garantir la formation et l'intégrité des jonctions serrées. La fourchette du nombre de repiquages de cellules doit faire l'objet d'un témoin pour assurer une formation régulière et reproductible des jonctions serrées. On privilégiera les cellules obtenues après 3 à 30 repiquages à partir de la décongélation, car les cultures situées dans cette plage présentent une fonctionnalité similaire, ce qui contribue à la reproductibilité des résultats de l'essai

En amont de l'essai de DF, les cellules sont détachées de la fiole par trypsinisation et centrifugées, puis la quantité nécessaire de cellules est repiquée dans les inserts placés dans des plaques 24 puits (voir appendice 1). Pour ce repiquage, on utilisera des inserts de 12 mm de diamètre équipés d'une membrane en esters cellulosiques mixtes de 80 à 150 μm d'épaisseur et percée de pores de 0.45 μm. L'étude de validation a été réalisée avec des inserts Millicell-HA 12 mm. Les propriétés de l'insert et du type de membrane sont importantes dans la mesure où elles peuvent modifier la croissance cellulaire et la formation de liaisons chimiques. Certains types de produits chimiques peuvent en effet se lier à la membrane de l'insert Millicell-HA, ce qui peut jouer sur l'interprétation des résultats. Il convient d'utiliser les produits chimiques d'épreuve de compétence (voir appendice 3) pour démontrer l'équivalence d'autres membranes, le cas échéant.

▼M7

La formation de liaisons chimiques avec la membrane de l'insert est plus courante avec les composés cationiques, comme le chlorure de benzalkonium, qui sont attirés par la membrane chargée (7). Ces liaisons chimiques sont susceptibles de prolonger le temps d'exposition au produit chimique étudié, et d'entraîner ainsi une surestimation de sa toxicité potentielle; elles peuvent aussi limiter physiquement la diffusion de fluorescéine à travers l'insert, en liant le colorant au composé cationique lui-même lié à la membrane, ce qui donne lieu à une sous-estimation de la toxicité potentielle du produit chimique d'essai. On peut évaluer ce phénomène directement en exposant la membrane seule à la concentration maximale du produit chimique testé, puis en ajoutant le colorant fluorescéine-sodium à la concentration normale et pendant le temps d'exposition standard (pas de témoins des cellules). Si la fluorescéine se lie à la membrane de l'insert, celle-ci paraît jaunie une fois que le produit chimique d'essai a été éliminé par lavage. Il est donc essentiel de connaître les affinités de liaison du produit chimique d'essai afin de pouvoir interpréter son effet sur les cellules.

Le repiquage des cellules sur les inserts doit permettre d'obtenir une monocouche confluente au moment de l'exposition chimique. On ajoute 1.6×10^5 cellules par insert (400 µl de suspension cellulaire avec une densité de 4×10^5 cellules/ml). Dans ces conditions, une monocouche confluente apparaît généralement après 96 heures de culture. Il convient d'examiner visuellement les inserts avant le repiquage, pour s'assurer que les lésions éventuellement consignées à l'occasion de la vérification visuelle décrite au paragraphe 30 découlent de la manipulation.

Les cultures de cellules MDCK sont maintenues dans des incubateurs en atmosphère humidifiée, à 5 ± 1 % de CO_2 et 37 ± 1 °C. Les cellules sont exemptes de toute contamination bactérienne, virale, mycoplasmique ou fongique.

Application des produits chimiques d'essai et témoins

Une nouvelle solution-mère du produit chimique à tester doit être préparée pour chaque série d'essai et utilisée dans les 30 minutes qui suivent sa préparation. Les produits chimiques d'essai sont préparés dans le HBSS avec calcium (à 1,0 — 1,8 mM) et sans rouge phénol, pour éviter les liaisons avec les protéines sériques. La solubilité du produit chimique à 250 mg/ml est évaluée avant l'essai. Si, à cette concentration, il forme une suspension ou une émulsion stable (c'est-à-dire qui reste uniforme et ne décante pas ou ne se sépare pas en plusieurs phases) pendant 30 minutes, on peut maintenir le choix du HBSS comme solvant. Néanmoins, si le produit chimique s'avère insoluble dans le HBSS à cette concentration, on envisagera de recourir à d'autres méthodes que l'essai de DF. La prudence est de mise concernant l'utilisation d'une huile minérale légère comme solvant, dans les cas où le produit chimique se révèle insoluble dans le HBSS, car les données accessibles sont insuffisantes pour conclure sur la performance de l'essai de DF dans ces conditions.

Tous les produits chimiques à évaluer sont préparés à partir de la solution-mère, dans du HBSS stérile avec calcium (à une concentration de 1.0 — 1.8 mM) et sans rouge phénol, en cinq dilutions dont les concentrations massiques sont fixées: 1, 25, 100 et 250 mg/ml ainsi qu'une solution pure ou saturée. En cas d'évaluation d'un composé solide, on inclura une très forte concentration de 750 mg/ml. Cette concentration de la substance d'essai doit parfois être appliquée sur les cellules à l'aide d'une pipette à déplacement positif. Si des effets toxiques apparaissent entre 25 et 100 mg/ml, il convient d'analyser également les concentrations suivantes à deux reprises: 1, 25, 50, 75 et 100 mg/ml. La DF_{20} sera déduite de ces concentrations, à condition que les critères d'acceptation soient satisfaits.

Avant d'appliquer les substances d'essai sur les monocouches de cellules confluentes, le milieu de culture cellulaire est retiré et les monocouches sont lavées deux fois avec du HBSS stérile avec calcium (à 1,0 — 1,8 mM) et sans rouge phénol amené à 37 °C. On aura préalablement effectué une vérification visuelle des filtres à la recherche d'éventuelles lésions déjà présentes et qui pourraient être faussement imputées à une incompatibilité potentielle avec le

▼M7

produit chimique d'essai. Pour chaque concentration du produit chimique d'essai et pour les témoins, on met en œuvre au moins trois réplicats par série d'essai. Après 1 min d'exposition à température ambiante, le produit chimique d'essai est soigneusement éliminé par pipetage, la monocouche est lavée deux fois avec du HBSS stérile amené à 37 °C avec calcium (à 1,0 — 1,8 mM) et sans rouge phénol, et la diffusion de fluorescéine est immédiatement quantifiée.

Les témoins concurrents négatifs (TN) et positifs (TP) sont présents dans chaque série d'essai pour démontrer que l'intégrité de la monocouche (TN) et la sensibilité des cellules (TP) sont dans une fourchette admissible, définie d'après les résultats historiques. Le composé recommandé comme TP est le Brij 35 (n°CAS 9002-92-0) à 100 mg/ml. Cette concentration devrait induire environ 30 % de diffusion de fluorescéine (plage admissible: 20 — 40 % de DF, donc de lésions de la couche cellulaire). Le composé recommandé comme TN est le HBSS avec calcium (à 1,0 — 1,8 mM) et sans rouge phénol (témoin à blanc non traité). Un témoin de la diffusion maximale est également inclus dans chaque série d'essai pour permettre de calculer les DF_{20}. La diffusion maximale est déterminée à l'aide d'un insert témoin ne contenant pas de cellules.

Détermination de la perméabilité à la fluorescéine

Immédiatement après avoir retiré les produits chimiques d'essai et témoins, ajouter aux inserts (Millicell-HA, par exemple) 400 µl de solution de fluorescéine-sodium à 0,1 mg/ml (soit 0,01 % en m/v dans du HBSS avec calcium [à 1,0 — 1,8 mM] et sans rouge phénol). Les cultures sont maintenues à température ambiante pendant 30 minutes. À l'issue de l'incubation avec la fluorescéine, les inserts sont délicatement retirés de tous les puits. On effectue une vérification visuelle de chaque filtre, et toute lésion éventuellement causée par la manipulation est consignée.

La quantité de fluorescéine diffusée à travers la monocouche et l'insert est mesurée dans la solution qui reste dans les puits après le retrait des inserts. Ces mesures sont effectuées avec un spectrofluorimètre à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 485 nm et 530 nm, respectivement. Il convient de régler la sensibilité du spectrofluorimètre de façon à obtenir une différence de valeur aussi large que possible entre la DF maximale (insert sans cellules) et la DF minimale (insert contenant la monocouche confluente traitée avec le TN). En raison des différences entre les spectrofluorimètres employés, il est suggéré de fixer la sensibilité de manière à obtenir une intensité de fluorescence > 4 000 pour le témoin de la diffusion maximale de fluorescéine. La valeur correspondant à la DF maximale ne doit pas dépasser 9 999. L'intensité de fluorescence correspondant à la diffusion maximale doit rester comprise dans la fourchette de fonctionnement linéaire du spectrofluorimètre utilisé.

Interprétation des résultats et modèle de prévision

La quantité de DF est proportionnelle aux lésions induites par le produit chimique d'essai sur les jonctions serrées. Le pourcentage de DF pour chaque concentration du produit chimique évalué est calculé à partir des DF obtenues pour ce produit en fonction des DF correspondant au TN (relevées pour la monocouche confluente de cellules traitées avec le TN) et au témoin de la diffusion maximale (relevés de la quantité de DF à travers un insert dépourvu de cellules).

Valeur moyenne de l'intensité de fluorescence de la diffusion maximale = x

Valeur moyenne de l'intensité de fluorescence pour une diffusion de 0 % (TN) = y

La diffusion de 100 % moyenne est calculée en soustrayant la diffusion de 0 % moyenne de la diffusion maximale moyenne,

soit x – y = z

On calcule le pourcentage de diffusion pour chaque dose fixée en soustrayant la diffusion de 0 % de la moyenne des intensités de fluorescence relevées pour les trois réplicats (m), puis en divisant la valeur obtenue par la diffusion de 100 %, soit %DF = [(m – y) / z] x 100 %, où:

▼M7

m = intensité de fluorescence moyenne des trois réplicats de la concentration concernée

%DF = pourcentage de fluorescéine qui se diffuse à travers la couche cellulaire

On applique l'équation suivante pour calculer la concentration de produit chimique induisant une DF de 20 %:

$$DF_D = [(A - B) / (C - B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

Où:

D = % d'inhibition

A = % de lésions (20 % de diffusion de fluorescéine)

B = % de diffusion de fluorescéine < A

C = % de diffusion de fluorescéine > A

M_C = concentration (mg/ml) de C

M_B = concentration (mg/ml) de B

La valeur seuil de la DF_{20} permettant de prévoir que les produits chimiques sont corrosifs/fortement irritants pour l'œil est indiquée ci-dessous:

DF_{20} (mg/ml)	C&E du SGH (ONU)	C&E du CLP (UE)	C&E de l'EPA (États-Unis)
≤ 100	Catégorie 1	Catégorie 1	Catégorie I

C&E: système de classification et d'étiquetage

La méthode d'essai de DF est recommandée exclusivement pour l'identification des substances hydrosolubles corrosives ou fortement irritantes pour l'œil (catégorie 1 du SGH, catégorie 1 du CLP, catégorie I de l'EPA) (voir paragraphes 1 et 10).

Pour qu'un produit chimique (substance ou mélange) hydrosoluble (3) (6) (7) soit classé comme provoquant des «lésions oculaires graves» (catégorie 1 du SGH et du CLP) ou comme «corrosif ou fortement irritant pour l'œil» (catégorie I de l'EPA), il faut que le produit chimique d'essai induise une $DF_{20} \leq 100$ mg/ml.

Acceptation des résultats

La valeur moyenne de la diffusion maximale de fluorescéine (x) doit dépasser 4 000 (voir paragraphe 31), la moyenne de la diffusion de 0 % (y) doit être inférieure ou égale à 300, et la moyenne de la diffusion de 100 % (z) doit tomber entre 3 700 et 6 000.

Un essai est considéré comme acceptable si le témoin positif provoque des lésions sur 20 à 40 % de la couche de cellules (déterminées en % de diffusion de fluorescéine).

RÉSULTATS ET RAPPORTS

Résultats

Pour chaque série, les données des puits correspondant à chaque réplicat (par exemple les intensités de fluorescence et les pourcentages de DF calculés pour chaque produit chimique d'essai, y compris leur classification) sont présentées sous forme de tableau. Il convient en outre de rapporter les moyennes ± écart-type des mesures correspondant à chaque réplicat pour chaque série d'essais.

▼M7

Rapport d'essai

Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Produits chimiques d'essai et témoins

— nom(s) chimique(s), par exemple nom de la structure chimique utilisé par le Chemical Abstracts Service (CAS), suivi d'autres noms, s'ils sont connus;

— numéro CAS du produit chimique, s'il est connu;

— pureté et composition de la substance ou du mélange (en pourcentage pondéral), dans la mesure où cette information est disponible;

— propriétés physico-chimiques utiles à la conduite de l'étude (par ex. état physique, volatilité, pH, stabilité, hydrosolubilité, classe chimique);

— le cas échéant, traitement des produits chimiques d'essai et témoins avant l'essai, (par ex. chauffage, broyage);

— conditions de stockage;

Justification de la méthode d'essai et du protocole utilisés

— considérations relatives au domaine d'applicabilité et aux limites de la méthode d'essai;

Conditions d'essai

— description du système cellulaire utilisé, y compris le certificat d'authenticité et le statut mycoplasmique de la lignée cellulaire;

— détails du mode opératoire utilisé;

— concentration(s) du produit chimique d'essai utilisé(s);

— durée de l'exposition au produit chimique d'essai;

— durée de l'incubation avec la fluorescéine;

— description de toutes les modifications du mode opératoire;

— description des critères d'évaluation utilisés;

— référence aux données historiques du modèle (par ex. témoins négatifs et positifs, substances de référence, le cas échéant);

— informations sur la compétence technique démontrée par le laboratoire;

Résultats

— tableau présentant les données pour chaque produit chimique d'essai, chaque témoin, chaque série d'essai et chaque réplicat (y compris les résultats individuels, les moyennes et les écarts-types);

— classification(s) déduite(s) et modèle de prévision et/ou critères de décision employés;

— description des autres effets observés;

▼**M7**

Discussion des résultats

— considérations relatives aux résultats non probants (paragraphe 35: DF_{20} > 100 mg/ml) et aux essais supplémentaires;

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

(1) ONU (2009), Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH), Troisième édition révisée, New York & Genève: Publications des Nations Unies. ISBN: 978-92-1-216509-7. Consultable à l'adresse: [http://live.unece.org/fr/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_f.html]

(2) U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington, DC: Agence de protection de l'environnement des États-Unis.

(3) ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based in vitro assays for eye irritation testing.

(4) Scott, L. et autres (2010), A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

(5) Chapitre B.5 de la présente annexe, Effet irritant/corrosif aigu sur les yeux.

(6) ECVAM (1999), protocole INVITTOX 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italie: Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (ECVAM). Consultable à l'adresse: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu]

(7) ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.

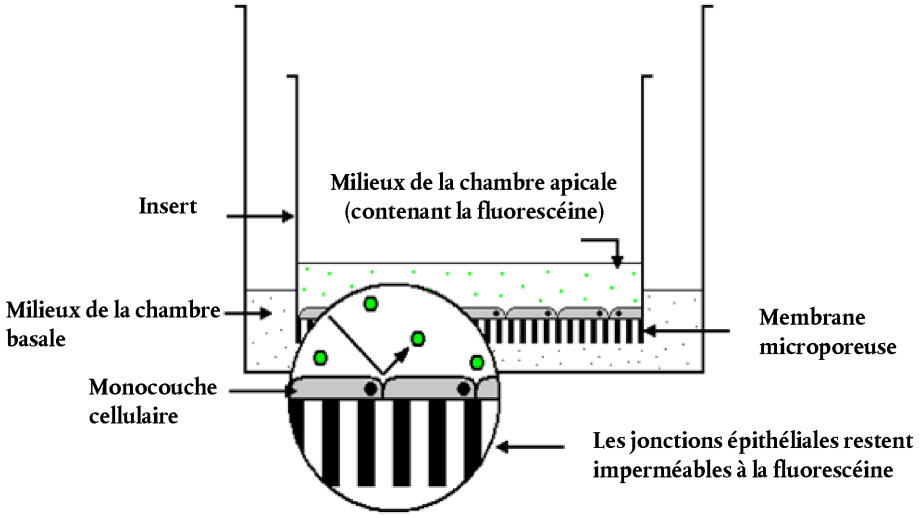
(8) OCDE (2005), *Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment*, Série de l'OCDE sur les essais et l'évaluation n° 34. OCDE, Paris.

▼M7

Appendice 1

DIAGRAMME REPRÉSENTANT LES CELLULES MDCK CULTIVÉES SUR LA MEMBRANE D'UN INSERT POUR LA MÉTHODE D'ESSAI DE DF

On cultive une couche confluente de cellules MDCK sur la membrane semi-perméable d'un insert. Les inserts sont placés dans les puits de plaques 24 puits.



Graphique tiré de: Wilkinson, P.J. (2006) Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure. Thèse de doctorat, Université de Nottingham, Royaume-Uni

▼M7

Appendice 2

DÉFINITIONS

Catégorie I de l'EPA: produits chimiques induisant un effet corrosif (destruction irréversible des tissus oculaires) ou des complications cornéennes ou une irritation persistant plus de 21 jours (2).

Catégorie 1 du SGH: lésion des tissus oculaires ou dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'un produit chimique d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui n'est pas totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application.

CLP de l'UE [Règlement (CE) n° 1272/2008 de la Commission européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges]: vise la mise en œuvre dans l'Union européenne (UE) du SGH de l'ONU pour la classification des produits chimiques (substances et mélanges).

Danger: propriété inhérente d'un agent ou d'une situation susceptible de provoquer des effets néfastes lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-)population est exposé(e) à cet agent.

DF_{20}: peut être estimée en déterminant la concentration à laquelle le produit chimique d'essai induit 20 % de diffusion de fluorescéine à travers la couche de cellules.

Diffusion de fluorescéine: quantité de fluorescéine qui traverse la couche cellulaire, mesurée par spectrofluorimétrie.

Essai substitutif: essai conçu pour remplacer un autre essai utilisé en routine et accepté, servant à l'identification des dangers et/ou l'évaluation des risques, et dont il a été démontré qu'il assure, par rapport à l'essai accepté, une protection équivalente ou accrue de la santé humaine ou animale ou de l'environnement, selon les cas, pour toutes les situations et substances d'essai possibles.

Fiabilité: mesure dans laquelle la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires ainsi que la répétabilité intra-laboratoire.

Lésion oculaire grave: lésion des tissus oculaires ou dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'un produit chimique d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui n'est pas totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application.

Mélange: dans le contexte du SGH ONU, désigne un mélange ou une solution composé(e) de deux substances ou plus qui n'interagissent pas.

Méthode d'essai validée: méthode d'essai ayant fait l'objet d'études de validation visant à déterminer sa pertinence (notamment sa précision) et sa fiabilité à des fins spécifiques. Il importe de noter que les performances d'une méthode d'essai validée peuvent être insuffisantes en termes de précision et de fiabilité pour qu'elle soit jugée acceptable pour les besoins envisagés (8).

Non classé: produit chimique qui n'est pas classé comme irritant oculaire au sens des catégories 1, 2A, ou 2B du SGH (ONU); des catégories 1 ou 2 du CLP (UE); ou des catégories I, II et III de l'EPA (États-Unis).

Pertinence: description de la relation entre l'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité à des fins spécifiques. Elle définit le degré auquel l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (8).

▼M7

Poids de la preuve: prise en compte des atouts et des faiblesses de divers éléments d'information en vue d'aboutir à une conclusion concernant le danger potentiel d'une substance chimique et d'étayer cette conclusion.

Précision: degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa pertinence. Ce terme et celui de «concordance» sont souvent utilisés indifféremment pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique corrosif pour l'œil: (a) produit chimique provoquant des lésions irréversibles des tissus oculaires. (b) produit chimique classé comme irritant oculaire dans la catégorie 1 du SGH (ONU), la catégorie 1 du CLP (UE) ou la catégorie I de l'EPA (États-Unis).

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Produit chimique d'épreuve de compétence: produit chimique de la liste des produits chimiques de référence qu'un laboratoire peut employer pour démontrer sa compétence à mettre en œuvre la méthode d'essai de référence validée, s'il ne l'a encore jamais utilisée.

Produit chimique fortement irritant pour l'œil: (a) produit chimique provoquant des lésions des tissus oculaires suite à une application sur la face antérieure de l'œil, qui ne sont pas réversibles dans les 21 jours suivant l'application ou entraînent une dégradation sévère de la vue; (b) produit chimique classé comme irritant oculaire dans la catégorie 1 du SGH (ONU), la catégorie 1 du CLP (UE) ou la catégorie I de l'EPA (États-Unis).

Produit chimique irritant pour l'œil: (a) produit chimique provoquant une modification réversible de l'œil suite à une application sur la face antérieure de l'œil; (b) produit chimique classé comme irritant oculaire dans les catégories 2A ou 2B du SGH (ONU), la catégorie 2 du CLP (UE) ou les catégories II ou III de l'EPA (États-Unis).

Sensibilité: proportion des produits chimiques positifs/actifs correctement classés par l'essai. Il s'agit d'une mesure de la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriels, et d'un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (8).

SGH [Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (ONU)]: système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans le but de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement.

Spécificité: proportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont correctement classées par l'essai. Il s'agit d'une mesure de la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriels, et d'un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai.

Stratégie d'essais à plusieurs niveaux: démarche expérimentale séquentielle consistant à examiner toutes les informations existantes sur un produit chimique d'essai dans un ordre déterminé, en ayant recours à chaque étape à un processus d'analyse du poids de la preuve pour déterminer si les informations disponibles sont suffisantes pour décider d'une classification dans une catégorie de danger, avant de passer à l'étape suivante. Si le potentiel d'irritation d'un produit chimique d'essai peut être déterminé sur la base des informations existantes, aucun essai

▼M7

supplémentaire n'est nécessaire. Dans le cas contraire, une procédure expérimentale progressive de type séquentiel sur des animaux est alors lancée jusqu'à ce qu'une classification sans équivoque puisse être effectuée.

Substance: dans le contexte du SGH de l'ONU, désigne un élément chimique et ses composés à l'état naturel ou obtenus par un processus de fabrication, y compris tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit et toute impureté résultant du processus mis en œuvre, mais à l'exclusion de tout solvant pouvant être séparé de la substance sans en affecter la stabilité ni modifier la composition.

Taux de faux négatifs: proportion de tous les produits chimiques positifs faussement identifiés comme négatifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Taux de faux positifs: proportion de tous les produits chimiques négatifs faussement identifiés comme positifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Témoin de solvant/véhicule: échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, y compris le solvant ou véhicule utilisé pour tester les échantillons témoins traités ou non avec la substance d'essai afin de déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec la substance d'essai dissoute dans le même solvant ou véhicule. Testé avec un témoin négatif concurrent, cet échantillon indique également si le solvant ou véhicule interagit avec le système d'essai.

Témoin négatif: réplicat non traité contenant tous les composants d'un système d'essai. Cet échantillon subit les mêmes procédures que les échantillons traités avec le produit chimique d'essai et les autres échantillons témoins afin de déterminer si le solvant interagit avec le système d'essai.

Témoin positif: réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai et traité avec un produit chimique induisant notoirement une réponse positive. Pour permettre d'évaluer la variabilité de la réponse du témoin positif dans le temps, l'ampleur de la réponse positive ne doit pas être excessive.

▼M7

Appendice 3

PRODUITS CHIMIQUES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE POUR LA MÉTHODE D'ESSAI DE DF

Avant d'utiliser en routine la présente méthode d'essai, les laboratoires démontrent leurs compétences techniques en déterminant correctement la catégorie de corrosivité oculaire des 8 produits chimiques recommandés dans le tableau 1. Ces produits chimiques ont été sélectionnés de façon à représenter la gamme des réactions locales d'irritation/de corrosion oculaire, sur la base des résultats de l'essai *in vivo* sur œil de lapin [ligne directrice 405, méthode d'essai B.5 (5)] (c'est-à-dire les catégories 1, 2A, 2B, ou Non classé du SGH de l'ONU). Toutefois, compte tenu de l'utilité validée de ces essais (pour identifier uniquement les substances corrosives/fortement irritantes pour l'œil), seuls deux résultats expérimentaux obtenus à des fins de classification (substance corrosive/fortement irritante ou substance non corrosive/non sévèrement irritante) permettent de démontrer les compétences des laboratoires. Les autres critères de sélection retenus ont trait à la disponibilité des produits chimiques dans le commerce, à la disponibilité de données de référence *in vivo* de bonne qualité, et à l'existence de données de bonne qualité obtenues par la méthode d'essai de DF. C'est pourquoi les produits chimiques d'épreuve de compétence choisis sont issus du «Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing» (8), qui a servi à la validation rétrospective de la méthode d'essai de DF.

Tableau 1

Produits chimiques recommandés pour démontrer la compétence technique des laboratoires au regard de l'essai de DF

Produit chimique	N° CAS	Classe chimique (1)	Forme physique	Classification *in vivo* (2)	Classification *in vitro* (3)
Chlorure de benzalkonium (5 %)	8001-54-5	Composé onium	Liquide	Catégorie 1	Corrosif/ fortement irritant
Hydrochlorure de prométhazine	58-33-3	Amine/amidine, hétérocyclique, composé organo-sulfuré	Solide	Catégorie 1	Corrosif/ fortement irritant
Hydroxyde de sodium (10 %)	1310-73-2	Base	Liquide	Catégorie 1	Corrosif/ fortement irritant
Laurylsulfate de sodium (15 %)	151-21-3	Acide carboxylique (sel)	Liquide	Catégorie 1	Corrosif/ fortement irritant
4-carboxy-benzaldéhyde	619-66-9	Acide carboxylique, aldéhyde	Solide	Catégorie 2(A)	Non corrosif/ faiblement irritant
Nitrate d'ammonium	6484-52-2	Sel inorganique	Solide	Catégorie 2(A)	Non corrosif/ faiblement irritant
2-méthylacéto-acétate d'éthyle	609-14-3	Cétone, ester	Liquide	Catégorie 2(B)	Non corrosif/ faiblement irritant
Glycérol	56-81-5	Alcool	Liquide	Aucune catégorie	Non corrosif/ faiblement irritant

Abréviations: N° CAS = Numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service

(1) Les classes de produits chimiques ont été attribuées à chaque produit chimique d'essai à l'aide d'un système de classification normalisé, fondé sur le système de classification du Medical Subject Headings (MeSH) de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis (disponible sur http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) D'après les résultats de l'essai *in vivo* sur œil de lapin (ligne directrice n° 405 de l'OCDE, méthode d'essai B.5) et en utilisant le SGH (ONU) et le CLP de l'UE.

(3) D'après les résultats obtenus avec l'essai de DF [Protocole INVITTOX n° 71(6)].

▼M7

B.62. TEST DES COMÈTES *IN VIVO* EN CONDITIONS ALCALINES SUR CELLULES DE MAMMIFÈRES

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 489 (2016) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Le test des comètes in vivo en conditions alcalines (technique d'électrophorèse de cellules isolées en gel d'agarose), appelé simplement ci-après «test des comètes», est utilisé pour la détection des cassures de brins d'ADN dans des cellules ou noyaux isolés à partir de divers tissus d'animaux, habituellement des rongeurs, qui ont été exposés à un/des produit(s) potentiellement génotoxique(s). Le test des comètes a été examiné et des recommandations ont été publiées par divers groupes d'experts (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). La présente méthode d'essai s'inscrit dans une série de méthodes d'essai sur la toxicologie génétique. Par ailleurs, un document de l'OCDE qui fournit des informations succintes sur les essais de génotoxicité et donne une vue d'ensemble des modifications récemment apportées à ces lignes directrices a été élaboré (1).

Le test des comètes a pour objet d'identifier les produits chimiques causant des dommages à l'ADN. En conditions alcalines (pH > 13), le test des comètes peut détecter les cassures simple- et double-brin résultant, par exemple, d'interactions directes avec l'ADN, de sites alcali-labiles ou de cassures transitoires liées à des mécanismes de réparation par excision. Ces cassures peuvent être réparées, leur effet étant alors non persistant, elles peuvent être létales pour la cellule, ou elles peuvent se fixer sous forme de mutation stable se traduisant par une altération viable permanente. Elles peuvent aussi entraîner des dommages chromosomiques du type de ceux qui sont associés à de nombreuses maladies humaines comme le cancer.

Des études de validation formelle du test des comètes in vivo sur les rongeurs ont été coordonnées en 2006-2012 par le Centre japonais pour la validation des méthodes alternatives (JaCVAM), en collaboration avec le Centre européen pour la validation des méthodes alternatives (ECVAM), le Comité de coordination inter-agences pour la validation des méthodes alternatives (ICCVAM) et le Centre inter-agences pour l'évaluation des méthodes toxicologiques alternatives du NTP (NICEATM) (12). La présente méthode d'essai indique les applications recommandées et les limites du test des comètes; elle est fondée sur le protocole final (12) utilisé dans les essais de validation, et sur d'autres données pertinentes, publiées ou non (données privées des laboratoires).

Les termes-clés sont définis à l'appendice 1. On notera qu'un grand nombre de supports différents peuvent être utilisés pour ce test (lames de microscope, spots de gel, plaques 96 puits, etc.). Pour des raisons pratiques, le terme de «lame» désigne dans ce qui suit l'ensemble de ces supports.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

Le test des comètes est une méthode utilisée pour mesurer les cassures de brins d'ADN dans les cellules eucaryotes. Des cellules/noyaux isolés inclus dans un gel d'agarose déposé sur une lame sont lysés sous l'action d'un détergent et de sels à forte concentration. Cette étape de lyse digère les membranes cellulaires et nucléaires et libère des boucles d'ADN enroulé, généralement appelées nucléoïdes ou fragments d'ADN. L'électrophorèse à pH élevé produit des structures ressemblant à des comètes qui, si l'on utilise les colorants fluorescents appropriés, peuvent être observées par microscopie à fluorescence; les fragments d'ADN migrent de la «tête» vers la «queue» de la comète, selon leur taille, et l'intensité de fluorescence de la queue par rapport à l'intensité totale (tête plus queue) reflète l'ampleur des cassures de l'ADN (13) (14) (15).

Le test des comètes in vivo en conditions alcalines se prête particulièrement bien à l'évaluation du risque génotoxique, dans la mesure où les réponses au test sont dépendantes de l'ADME (absorption, distribution, métabolisme et excrétion) in vivo, ainsi que des processus de réparation de l'ADN. Ces paramètres peuvent varier selon les espèces, les tissus et les types de dommages subis par l'ADN.

▼M7

Pour satisfaire aux exigences en matière de bien-être animal, en particulier en ce qui concerne la réduction de l'utilisation d'animaux (règle des 3Rs — Reduction, Refinement, Replacement, à savoir réduction du nombre d'animaux, réduction des souffrances des animaux, remplacement de l'expérimentation animale par d'autres méthodes), ce test peut aussi être intégré à d'autres études toxicologiques, telles que les études de toxicité à doses répétées (10) (16) (17), ou le paramètre étudié peut être combiné à d'autres paramètres de génotoxicité, dans le cas par exemple du test des micronoyaux sur érythrocytes de mammifères in vivo (18) (19) (20). Le test des comètes est le plus souvent réalisé sur des rongeurs, bien qu'il ait été appliqué à d'autres espèces, mammifères ou non. L'utilisation d'espèces autres que des rongeurs devra être justifiée au cas par cas du point de vue scientifique et éthique, et il est fortement recommandé de ne réaliser le test des comètes sur des espèces autres que des rongeurs que dans le cadre d'une autre étude de toxicité, et non en tant qu'essai indépendant.

La sélection de la voie d'exposition et du/des tissu(s) à étudier sera fondée sur l'ensemble des connaissances existantes/disponibles concernant les produits chimiques testés, par exemple la voie d'exposition humaine prévue/anticipée, le métabolisme et la distribution, le potentiel d'effets au site de contact, les alertes structurelles, d'autres données de génotoxicité ou de toxicité, ainsi que l'objectif de l'étude. Le potentiel génotoxique des produits chimiques testés peut ainsi être étudié, s'il y a lieu, sur le(s) tissu(s) cible(s) d'un effet cancérogène et/ou d'autres effets toxiques. Le test est également considéré comme utile pour explorer plus avant un effet génotoxique détecté dans un système in vitro. Il est opportun de réaliser un test des comètes in vivo sur un tissu donné si l'on peut raisonnablement s'attendre à ce que ce tissu soit exposé de façon adéquate.

Les études de validation les plus complètes dont le test ait fait l'objet ont porté sur les tissus somatiques de rats mâles, dans le cadre d'études interlaboratoires internationales du JaCVAM (12) ou dans Rothfuss et al. 2010 (10). Le foie et l'estomac ont été utilisés dans les études de validation internationales du JaCVAM. Le foie, parce que c'est l'organe le plus actif dans le métabolisme des produits chimiques, et que c'est fréquemment un organe cible pour la cancérogénicité. L'estomac, parce que c'est généralement le premier site de contact avec les produits chimiques en cas d'exposition orale, bien que d'autres régions du tractus gastro-intestinal, comme le duodénum et le jéjunum, puissent aussi être envisagées comme sites de contact et soient peut-être plus pertinentes pour l'homme que l'estomac glandulaire des rongeurs. On veillera à ce que ces tissus ne soient pas exposés à des concentrations trop élevées du produit chimique testé (21). La technique est applicable en principe à tout tissu dont il est possible de dériver des suspensions de cellules/noyaux isolés analysables. Les données privées de nombreux laboratoires démontrent qu'elle peut être appliquée avec succès à un grand nombre de tissus différents, et de nombreuses publications montrent son applicabilité à des organes ou tissus autres que le foie et l'estomac, comme le jéjunum (22), les reins (23) (24), la peau (25) (26), ou des cellules provenant de la vessie (27) (28) ou de lavages pulmonaires ou bronchoalvéolaires (dans le cas d'études portant sur des substances inhalées) (29) (30); des tests ont également été réalisés sur plusieurs organes simultanément (31) (32).

S'il peut être intéressant d'étudier les effets génotoxiques sur des cellules germinales, on notera que le test des comètes standard en conditions alcalines tel qu'il est décrit dans la présente méthode d'essai n'est pas considéré comme approprié pour mesurer les cassures de brins d'ADN dans des cellules germinales matures. Étant donné que, s'agissant des dommages à l'ADN, des niveaux de fond élevés et variables ont été rapportés dans une revue de la littérature portant sur l'utilisation du test des comètes dans les études de génotoxicité sur les cellules germinales (33), des modifications du protocole et des études améliorées de validation et de standardisation sont jugées nécessaires avant que le test des comètes sur cellules germinales matures (cellules spermatiques, par exemple) puisse être inclus dans la présente méthode d'essai. De plus, le régime d'exposition recommandé dans cette méthode d'essai n'est pas optimal et seuls des temps d'exposition ou d'échantillonnage plus longs permettraient une analyse valable des cassures de brins d'ADN dans le sperme mature. Les effets génotoxiques mesurés par le test des comètes sur des cellules testiculaires à différents stades de différenciation ont été décrits dans la littérature (34) (35). Il convient cependant de noter que les gonades contiennent un mélange de cellules somatiques et de cellules germinales. Pour cette raison, des résultats positifs sur l'ensemble des gonades (testicules) ne témoignent pas nécessairement de dommages touchant les cellules germinales; ils indiquent néanmoins que le/les produit(s) chimique(s) testé(s) et/ou ses/leurs métabolites ont atteint les gonades.

▼M7

Les pontages ne peuvent pas être détectés de façon fiable dans les conditions expérimentales standard du test des comètes. Dans certaines conditions expérimentales modifiées, des pontages ADN-ADN et ADN-protéine, ainsi que d'autres modifications des bases telles que des bases oxydées pourraient être détectées (23) (36) (37) (38) (39). Des études complémentaires seraient nécessaires pour caractériser de façon adéquate les modifications à apporter au protocole. La détection des agents responsables de pontages n'est donc pas l'objectif premier du test décrit ici. Celui-ci n'est pas adapté, même en cas de modifications, pour la détection des substances aneugènes.

Dans l'état actuel des connaissances, le test des comètes in vivo présente une série d'autres limites (voir l'appendice 3). Il faut s'attendre à ce que la présente méthode d'essai soit révisée à l'avenir et modifiée s'il y a lieu à la lumière des acquis de l'expérience.

Avant d'utiliser la méthode d'essai sur un mélange pour générer des données avec pour objectif recherché l'application réglementaire, on examinera si, et si oui pourquoi, elle peut fournir des résultats adéquats à cette fin. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Les animaux sont exposés au produit chimique d'essai par une voie d'exposition idoine. Une description précise de l'administration des doses et de l'échantillonnage est donnée aux paragraphes 36-40. Au(x) moment(s) retenu(s) pour l'échantillonnage, les tissus à étudier sont disséqués et des suspensions de cellules/noyaux isolés sont préparées (une perfusion in situ peut être pratiquée si cela est jugé utile, par exemple, pour le foie) et incluses dans un gel d'agarose pour être fixées sur des lames. Les cellules/noyaux sont traités avec un tampon de lyse pour éliminer la membrane cellulaire et/ou nucléaire, et exposés à une base forte (de pH $\geq$ 13, par exemple) pour permettre le déroulement de l'ADN et la libération des boucles et fragments d'ADN déroulés. L'ADN nucléaire dans l'agar est alors soumis à l'électrophorèse. Les molécules d'ADN normales, non fragmentées, restent dans la position où l'ADN nucléaire se trouvait dans l'agar, tandis que tous les fragments d'ADN et boucles d'ADN déroulées migrent vers l'anode. Après l'électrophorèse, l'ADN est visualisé au moyen d'un colorant fluorescent approprié. Les préparations doivent être analysées au microscope et au moyen de systèmes d'analyse d'image automatiques ou semi-automatiques. L'ampleur de la migration de l'ADN au cours de l'électrophorèse et la distance de migration reflètent la quantité et la taille des fragments d'ADN. Différents paramètres peuvent être évalués dans le test des comètes. La proportion d'ADN présent dans la queue, ou intensité de la queue (% tail DNA, ou % tail intensity) a été recommandée pour évaluer les dommages à l'ADN (12) (40) (41) (42). Après analyse d'un nombre suffisant de noyaux, les résultats du test sont interprétés à l'aide de méthodes d'analyse appropriées.

On notera que les modifications apportées à des aspects de la méthodologie tels que la préparation des échantillons, les conditions d'électrophorèse, les paramètres d'analyse visuelle (intensité du colorant, intensité lumineuse de l'ampoule du microscope, par exemple, ou mise en place de filtres sur le microscope et paramètres dynamiques de la caméra) et les conditions ambiantes (éclairage de fond, par exemple) peuvent affecter la migration de l'ADN (43) (44) (45) (46).

VÉRIFICATION DES COMPETENCES DU LABORATOIRE

Chaque laboratoire doit établir ses compétences pour la réalisation du test des comètes, en démontrant son aptitude à obtenir des suspensions de cellules ou de noyaux isolés d'une qualité suffisante pour chaque tissu cible de chaque espèce étudiée. La qualité des préparations sera évaluée avant tout d'après le pourcentage d'ADN présent dans la queue des comètes chez les animaux traités par le véhicule, pour lesquels les valeurs doivent se situer dans une plage basse reproductible. Les données actuelles suggèrent que le pourcentage moyen d'ADN de queue du groupe (d'après la moyenne des médianes — voir le paragraphe 57 pour ces termes) dans le foie de rat devrait, de préférence, ne pas dépasser 6 %, ce qui serait cohérent avec les valeurs des essais de validation du JaCVAM (12) et d'autres données publiées ou privées. On ne dispose pas de données suffisantes à l'heure actuelle pour formuler des recommandations sur les plages optimales ou

▼M7

acceptables concernant d'autres tissus, ce qui n'exclut pas de recourir à d'autres tissus si cela se justifie. Le rapport d'essai devra rendre compte de façon appropriée de la conduite du test des comètes sur ces tissus en faisant référence à la littérature publiée ou à des données privées. Premièrement, un faible pourcentage d'ADN de queue chez les témoins est souhaitable afin de disposer d'une plage dynamique suffisante pour détecter un effet positif. Deuxièmement, chaque laboratoire doit être en mesure de reproduire les réponses attendues pour des mutagènes directs et des promutagènes, pour différents modes d'action, selon les exemples proposés au tableau 1 (paragraphe 29).

Des substances positives peuvent être sélectionnées, par exemple à partir des essais de validation du JaCVAM (12) ou d'autres données publiées (voir paragraphe 9), s'il y a lieu, moyennant une justification et en établissant la preuve de réponses clairement positives dans les tissus d'intérêt. La capacité à détecter les effets faibles de mutagènes connus tels que l'EMS à faibles doses doit également être démontrée, en établissant par exemple des relations dose-réponse avec des nombres de doses et des écarts entre doses appropriés. Les efforts doivent porter dans un premier temps sur l'établissement des compétences pour les tissus les plus couramment utilisés, le foie de rongeurs par exemple, pour lesquels il est possible d'effectuer une comparaison avec les données existantes et les résultats attendus (12). Les données provenant d'autres tissus (estomac/duodénum/jéjunum, sang, etc.) pourraient être collectées simultanément. Le laboratoire devra faire la preuve de sa compétence pour chaque tissu de chaque espèce qu'il prévoit d'étudier, et démontrer qu'une réponse positive acceptable peut être obtenue avec un mutagène connu (l'EMS, par exemple) sur ces tissus.

Il convient de collecter les données sur les témoins négatifs/traités par le véhicule afin de démontrer la reproductibilité des réponses négatives et d'établir que les aspects techniques de l'essai ont été correctement maîtrisés, ou de suggérer la nécessité d'établir de nouvelles plages de données des témoins historiques (voir paragraphe 22).

On notera que, si plusieurs tissus peuvent être collectés lors de la nécropsie et traités en vue de l'analyse des comètes, le laboratoire doit être compétent pour recueillir différents tissus sur un même animal, assurant ainsi qu'aucune lésion potentielle de l'ADN ne sera négligée et que l'analyse des comètes ne sera pas compromise. L'intervalle de temps entre le sacrifice des animaux et le prélèvement des tissus en vue de leur traitement peut être critique (voir paragraphe 44).

Le bien-être animal doit être pris en compte lors du développement des compétences pour ce test, et des tissus provenant d'animaux utilisés pour d'autres tests peuvent être utilisés pour se former aux différents aspects du test. De plus, il peut ne pas être nécessaire de conduire une étude complète lors des étapes d'établissement d'une nouvelle méthode d'essai dans un laboratoire, et il est possible de réduire le nombre d'animaux ou le nombre de concentrations étudiées lors de l'acquisition des gestes nécessaires.

Données des témoins historiques

Dans le cadre de la vérification des compétences, le laboratoire mettra en place une base de données historiques établissant les plages et distributions des témoins positifs et négatifs pour les tissus et espèces étudiés. On trouve dans la littérature (47) des recommandations sur la façon de constituer et d'utiliser ces données historiques (critères d'inclusion et d'exclusion des données dans la base, et critères d'acceptabilité pour une expérimentation donnée). Différents tissus et différentes espèces, ainsi que différents véhicules et voies d'administration, peuvent donner des pourcentages d'ADN dans la queue différents pour les témoins négatifs. Il importe donc d'établir les plages des témoins négatifs pour chaque tissu et chaque espèce. Les laboratoires doivent avoir recours à des méthodes de contrôle de la qualité telles que des graphiques statistiques [cartes C ou cartes X-barre, par exemple (48)], afin de déterminer la variabilité de leurs

▼M7

données et de démontrer leur maîtrise de la méthodologie. Le choix des substances chimiques utilisées comme témoins positifs, des gammes de doses et des conditions expérimentales (conditions de l'électrophorèse, par exemple) peut devoir être optimisé pour la détection d'effets faibles (voir paragraphe 17).

Toute modification du protocole expérimental doit être étudiée en termes de cohérence avec les bases de données des témoins historiques existantes du laboratoire. Toute incohérence majeure doit conduire à l'établissement d'une nouvelle base de données des témoins historiques.

DESCRIPTION DE LA METHODE

Préparations

Choix des espèces animales

On choisit habituellement des souches communément utilisées en laboratoire de jeunes rongeurs adultes sains (âgés de 6 à 10 semaines au début du traitement, bien que des animaux un peu plus âgés soient également acceptables). Le choix de l'espèce de rongeur doit être fondé sur (i) les espèces utilisées dans d'autres études de toxicité (pour qu'il soit possible de corréler les données et pour permettre des études intégrées), (ii) les espèces qui ont développé des tumeurs dans une étude de cancérogénicité (lors d'investigations portant sur le mécanisme de cancérogenèse), ou (iii) les espèces dont le métabolisme est le plus proche de celui de l'homme, si elles sont connues. Les rats sont couramment utilisés dans cet essai. Il est toutefois possible de recourir à d'autres espèces si cela est justifié d'un point de vue éthique et scientifique.

Conditions d'encagement et d'alimentation des animaux

Pour les rongeurs, la température de l'animalerie est idéalement de 22 °C (± 3 °C). L'humidité relative, qui est idéalement de 50 à 60 %, doit atteindre au moins 30 % et de préférence ne pas dépasser 70 %, sauf durant le nettoyage du local. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire des animaux est le régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété. Le choix des aliments peut être influencé par la nécessité d'assurer une bonne incorporation du produit chimique dans la nourriture si l'administration se fait par cette voie. Les rongeurs sont mis en cage par petits groupes comprenant généralement un maximum de cinq animaux du même sexe si aucun comportement agressif n'est à craindre. Les animaux peuvent être encagés individuellement si cela est justifié du point de vue scientifique. Dans la mesure du possible, le fond des cages doit être plein, les fonds grillagés pouvant provoquer de graves blessures (49). Un enrichissement environnemental approprié doit être fourni.

Preparation des animaux

Les animaux sont répartis de manière aléatoire entre les groupes traités et les groupes témoins. Ils sont identifiés individuellement et gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours avant le commencement de l'étude, afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire. La méthode d'identification individuelle des animaux doit être la moins invasive possible. Les méthodes appropriées sont notamment le baguage, l'étiquetage, la pose d'une puce électronique et l'identification biométrique. L'utilisation d'agrafes au niveau de la patte ou de l'oreille n'est pas scientifiquement justifiée pour ces essais. Les cages doivent être placées de façon à réduire au minimum l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats. Au début de l'étude, la variation pondérale des animaux doit être minimale et ne pas excéder ± 20 %.

Préparation des doses

Lorsque les produits chimiques testés sont solides, ils sont dissous ou mis en suspension dans des véhicules appropriés, ou incorporés aux aliments ou à l'eau de boisson avant d'être administrés aux animaux. Les produits chimiques liquides peuvent être administrés directement ou dilués avant d'être administrés. En cas d'exposition par inhalation, les produits chimiques testés peuvent être administrés sous forme de gaz, de vapeur ou d'aérosol solide ou liquide, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (50) (51).

▼M7

On utilisera des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage et définissent les conditions de stockage appropriées.

Conditions de l'essai

Véhicule

Le véhicule ne doit pas produire d'effets toxiques aux volumes administrés, ni être suspecté de réagir avec les produits chimiques d'essai. Le recours à des véhicules inhabituels doit être justifié par des données de référence faisant état de leur compatibilité eu égard aux animaux d'essai, à la voie d'administration et à l'effet mesuré. Il est recommandé d'envisager en premier lieu l'utilisation d'un solvant/véhicule aqueux chaque fois que c'est possible. On notera que certains véhicules (en particulier les véhicules visqueux) peuvent induire une inflammation et augmenter le niveau de fond des cassures de brins d'ADN au site de contact, en particulier en cas d'administration répétée.

Témoins

Témoins positifs

A l'heure actuelle, chaque essai doit normalement inclure un groupe d'au moins trois animaux analysables du même sexe, ou de chaque sexe si les deux sont utilisés (voir paragraphe 32), traités avec un produit chimique utilisé comme témoin positif. Il se peut qu'à l'avenir, le laboratoire puisse démontrer que ses compétences permettent de réduire le nombre de témoins positifs. Si plusieurs moments d'échantillonnage sont prévus (par exemple dans le cas d'un protocole comportant une seule administration), il n'y a lieu d'inclure des témoins positifs que pour l'un des moments d'échantillonnage, mais il importe de veiller à une répartition équilibrée (voir paragraphe 48). Il n'est pas nécessaire d'administrer les substances chimiques utilisées simultanément comme témoins positifs par la même voie que le produit chimique testé, mais il importe d'utiliser la même voie pour mesurer les effets au site de contact. Il doit être établi que les substances utilisées comme témoins positifs induisent des cassures de brins d'ADN dans tous les tissus d'intérêt pour le produit chimique testé, et l'EMS sera sans doute le témoin positif de choix dans la mesure où il a provoqué des cassures de brins d'ADN dans tous les tissus sur lesquels il a été étudié. Les doses des substances chimiques utilisées comme témoins positifs sont sélectionnées de manière à produire des effets modérés permettant une évaluation éclairée des performances et de la sensibilité du test; elles peuvent être fondées sur les courbes dose-réponse établies par le laboratoire dans le cadre de la démonstration de ses compétences. Le pourcentage d'ADN de queue chez les témoins positifs simultanés doit être en cohérence avec la plage préétablie par le laboratoire pour chaque tissu et moment d'échantillonnage pour l'espèce considérée (voir paragraphe 16). Des exemples de substances chimiques utilisées comme témoins positifs et de certains de leurs tissus cibles (chez les rongeurs) figurent au tableau 1. Des substances chimiques autres que celles du tableau 1 peuvent être sélectionnées si cela est scientifiquement justifié.

Tableau 1

Exemples de substances utilisées comme témoins positifs et de certains de leurs tissus cibles

Substances et n° CAS
Éthyl méthanesulfonate (n° CAS 62-50-0), tout tissu
Éthyl nitrosourée (n° CAS 759-73-9), foie et estomac, duodénum ou jéjunum
Méthyl méthanesulfonate (n° CAS 66-27-3), foie, estomac, duodénum ou jéjunum, cellules obtenues par lavage pulmonaire et bronchoalvéolaire, reins, vessie, poumons, testicules et moelle osseuse/sang
N-Méthyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (n° CAS 70-25-7), estomac, duodénum ou jéjunum
1,2-Diméthylhydrazine 2HCl (n° CAS 306-37-6), foie et intestin
N-méthyl-*N*-nitrosourée (n° CAS 684-93-5), foie, moelle osseuse, sang, reins, estomac, jéjunum et cerveau.

▼M7

Témoins négatifs

Un groupe d'animaux témoins négatifs auxquels est administré le véhicule seul, et qui sont traités par ailleurs de la même façon que les groupes exposés, doit être inclus dans chaque essai pour chaque moment d'échantillonnage et chaque tissu. Le pourcentage d'ADN de queue chez les animaux témoins négatifs doit se trouver dans la plage de référence préétablie par le laboratoire pour chaque tissu et chaque moment d'échantillonnage pour cette espèce (voir paragraphe 16). En l'absence de données historiques ou publiées sur les témoins montrant que le véhicule choisi, le nombre d'administrations ou la voie d'administration n'induisent aucun effet délétère ou génotoxique, des études préliminaires seront réalisées avant d'entreprendre l'étude complète, afin d'établir l'acceptabilité des témoins recevant le véhicule.

MODE OPÉRATOIRE

Nombre et sexe des animaux

Bien qu'il existe peu de données sur des animaux femelles permettant des comparaisons entre sexes dans le cas du test des comètes, les réponses aux autres tests de génotoxicité *in vivo* sont généralement similaires chez les animaux mâles et femelles, et la plupart des études pourrait donc être réalisée sur l'un ou l'autre des deux sexes. Des données démontrant des différences significatives entre les mâles et les femelles (par exemple sur le plan de la toxicité systémique, du métabolisme, de la biodisponibilité, etc comprenant également des données provenant par exemple d'études de détermination des doses) encouragent l'utilisation des deux sexes. Il peut donc être plus approprié dans ce cas de mener une étude sur les deux sexes, par exemple dans le cadre d'une étude de toxicité à doses répétées. Il pourrait être judicieux de recourir à un plan factoriel en cas d'utilisation des deux sexes. Des précisions sur cette méthode d'analyse des données sont fournies à l'appendice 2.

La taille des groupes au début de l'étude (et lors de l'établissement des compétences) doit permettre de disposer d'au moins cinq animaux analysables du même sexe ou de chaque sexe si les deux sont utilisés dans chaque groupe (et d'un nombre inférieur dans le groupe témoin positif concomitant — voir paragraphe 29). Si l'exposition humaine est spécifique pour un sexe, dans le cas par exemple de certains produits pharmaceutiques, l'essai sera pratiqué sur des animaux du sexe approprié. À titre d'information concernant le nombre maximum d'animaux généralement requis, une étude conduite selon les paramètres établis au paragraphe 33, impliquant trois groupes de traitement et des groupes concurrents de témoins négatifs et de témoins positifs (chaque groupe étant composé de cinq animaux du même sexe) nécessitera entre 25 et 35 animaux.

PROGRAMME DE TRAITEMENT

Les animaux doivent recevoir un traitement quotidien sur une période de 2 jours ou plus (c'est à dire deux traitements ou plus à intervalles de 24 heures environ), et les échantillons doivent être collectés une fois à 2-6 h (ou à T_{max}) après le dernier traitement (12). Des échantillons provenant de programmes de traitement prolongés (dose quotidienne pendant 28 jours, par exemple) sont acceptables. Il a été démontré que le test des comètes pouvait être combiné avec succès au test des micronoyaux sur érythrocytes (10) (19). Cependant, il convient d'accorder une grande attention à la logistique nécessaire pour pratiquer l'échantillonnage des tissus en vue du test des comètes tout en respectant les exigences relatives à celui effectué en vue d'autres types d'évaluations toxicologiques. La collecte 24 h après la dernière dose, classique pour une étude de toxicité générale, n'est pas appropriée dans la plupart des cas (voir le paragraphe 40 sur le moment d'échantillonnage). L'utilisation d'autres programmes de traitement et d'échantillonnage devra être justifiée (voir appendice 3). On pourra par exemple recourir à un traitement unique avec échantillonnages multiples, mais une étude comportant une seule administration nécessitera plus d'animaux, plusieurs moments d'échantillonnage étant requis; cette solution peut toutefois être préférable dans certains cas, par exemple lorsque la substance testée induit une toxicité excessive en cas d'administrations répétées.

▼M7

Quelle que soit la façon dont l'essai est réalisé, elle est acceptable si le produit chimique testé donne une réponse positive ou, en cas de réponse négative, si une preuve directe ou indirecte de l'exposition du/des tissu(s) cible(s) ou de la toxicité pour ce(s) tissu(s) est apportée, ou si la dose limite est atteinte (voir paragraphe 36).

Pour faciliter l'administration de volumes importants du produit chimique d'essai, celle-ci peut aussi être fractionnée, à raison de deux traitements le même jour à intervalle de deux à trois heures maximum. En pareil cas, le moment d'échantillonnage sera fixé en fonction du moment d'administration de la dernière fraction (voir paragraphe 40).

Niveaux de dose

Si l'on procède à une étude préliminaire de détermination des doses à administrer parce qu'on ne dispose pas de données fiables provenant d'autres études pertinentes pour orienter le choix des doses, l'étude préliminaire doit être effectuée dans le même laboratoire, en utilisant une espèce, une souche, un sexe et un régime de traitement identiques à ceux de l'étude principale, selon les principes en vigueur pour la conduite des études de détermination des doses. Cette étude devra avoir pour objectif de déterminer la dose maximale tolérée (DMT), définie comme la dose induisant de légers effets toxiques liés à la durée de l'étude (avec des signes cliniques clairs tels qu'un comportement ou des réactions anormales, une perte pondérale mineure ou un effet cytotoxique sur un tissu cible, par exemple), mais ne provoquant pas la mort ou des signes de douleur, de souffrance ou de détresse imposant de sacrifier les animaux. Pour un produit chimique non toxique administré sur une période de 14 jours ou plus, la dose (limite) maximale est de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour. Pour des périodes d'administration inférieures à 14 jours, la dose (limite) maximale est de 2 000 mg/kg de poids corporel/jour. Pour certains types de produits chimiques d'essai (produits pharmaceutiques à usage humain, par exemple) faisant l'objet de réglementations spécifiques, ces limites peuvent être différentes.

Les produits chimiques testés dont les propriétés toxicocinétiques sont saturées ou qui induisent un processus de détoxification pouvant se traduire par une baisse de l'exposition après une administration à long terme peuvent faire exception aux critères d'établissement des doses et doivent être évalués au cas par cas.

Pour les versions aiguë et subaiguë du test des comètes, outre la dose maximale (DMT, dose maximale possible, exposition maximale ou dose limite), une série supplémentaire d'au moins deux doses décroissantes présentant des écarts adaptés (facteur inférieur à $\sqrt{10}$, de préférence) doit être sélectionnée pour chaque moment d'échantillonnage afin de mettre en évidence d'éventuelles relations dose-effet. Cependant, les niveaux de dose utilisés doivent aussi couvrir dans la mesure du possible un intervalle compris entre la dose maximale et une dose produisant peu ou pas d'effet toxique. Lorsqu'une toxicité pour un tissu cible est observée à tous les niveaux de dose administrés, il est conseillé de procéder à des études complémentaires à des doses non toxiques (voir paragraphes 54-55). Les études visant à établir plus précisément l'allure de la courbe dose-réponse peuvent nécessiter un ou plusieurs groupes de traitement supplémentaires.

Administration des doses

Lors de la conception d'un essai, il convient de tenir compte de la voie d'exposition humaine anticipée. Par conséquent, les voies d'administration telles que l'alimentation, l'eau de boisson, l'inhalation, l'implantation ainsi que les voies topique, sous-cutanée, intraveineuse, orale (par gavage) et intratrachéale sont autant de choix valables, sous réserve qu'ils soient justifiés. Dans tous les cas, la voie retenue doit permettre une exposition adéquate du/des tissu(s) cible(s). L'injection intrapéritonéale n'est généralement pas recommandée, car elle n'est pas représentative de l'exposition humaine, et ne sera utilisée qu'en cas de justification spécifique (par exemple pour certaines substances chimiques utilisées comme témoins positifs, à des fins d'investigation, ou pour des médicaments administrés par voie intrapéritonéale). Le volume maximal de liquide administrable en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne devrait pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas

▼M7

des solutions aqueuses où l'on peut aller jusqu'à 2 ml/100 g de poids corporel. L'utilisation de volumes plus importants (si elle est autorisée par la législation relative au bien-être animal) doit être justifiée. Chaque fois que cela est possible, les différents niveaux de dose doivent être obtenus en ajustant la concentration de la formulation administrée pour assurer à tous les niveaux de dose un volume constant rapporté au poids corporel.

Moment d'échantillonnage

Le moment d'échantillonnage est une variable critique car il dépend de la période nécessaire pour que les substances chimiques atteignent leur concentration maximale dans le tissu cible et que des cassures de brins d'ADN soient induites, mais doit se situer avant que ces cassures ne disparaissent, ne soient réparées ou ne provoquent la mort de la cellule. La persistance de certaines des lésions conduisant aux cassures de brins d'ADN détectées par le test des comètes peut être très brève, du moins pour certains produits chimiques testés in vitro (52) (53). En conséquence, si des lésions transitoires de ce type sont suspectées, des mesures doivent être prises pour en limiter la disparition, en s'assurant que les tissus sont échantillonnés suffisamment tôt, éventuellement avant les délais par défaut indiqués ci-dessous. Le moment d'échantillonnage optimal peut dépendre du produit chimique ou de la voie d'administration, se traduisant en général par une exposition rapide du tissu lors d'une administration par voie intraveineuse ou par inhalation. Par conséquent, les moments d'échantillonnage seront déterminés en fonction des données cinétiques, quand elles sont disponibles (par exemple, temps (Tmax) auquel le pic de concentration (Cmax) dans le plasma ou le tissu est atteint, ou à l'état stationnaire en cas d'administrations multiples). En l'absence de données cinétiques, un compromis approprié pour la mesure de la génotoxicité est l'échantillonnage à 2-6 h du dernier traitement pour deux traitements ou plus, ou à 2 6 h et à 16-26 h d'une administration unique, mais il faut veiller à nécropsier tous les animaux au même moment après la dernière (ou l'unique) dose. Des informations sur la survenue d'effets toxiques dans les organes cibles (lorsqu'elles sont disponibles) peuvent également être utilisées pour sélectionner les moments d'échantillonnage appropriés.

Observations

Des observations cliniques générales relatives à la santé des animaux seront recueillies et consignées au moins une fois par jour, de préférence à la ou aux mêmes heures, en prenant en considération la période où les effets anticipés devraient être les plus marqués après l'administration (54). Au moins deux fois par jour, l'ensemble des animaux fait l'objet d'un constat de morbidité et de mortalité. Dans les études de longue durée, tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine et à la fin de l'essai. La consommation d'aliments doit être mesurée à chaque renouvellement des aliments et au moins une fois par semaine. Si le produit chimique testé est administré dans l'eau de boisson, la consommation d'eau est mesurée à chaque changement d'eau et au moins une fois par semaine. Les animaux montrant des signes non létaux de toxicité excessive sont euthanasiés avant la fin de l'essai, et ne sont généralement pas utilisés pour le test des comètes.

Collecte des tissus

L'induction de cassures des brins d'ADN (comètes) pouvant être étudiée sur pratiquement tous les tissus, la justification du choix du/des tissu(s) à prélever doit être clairement établie, compte tenu de la raison présidant à la conduite de l'étude et de l'ensemble des données disponibles sur l'ADME, la génotoxicité, la cancérogénicité ou d'autres effets toxiques des produits chimiques étudiés. La voie d'administration (fondée sur la/les voie(s) d'exposition humaine potentielle(s)), la distribution et l'absorption tissulaires prévues, le rôle du métabolisme et le mécanisme d'action possible des produits chimiques étudiés sont des facteurs importants à prendre en considération. Le foie est le tissu qui a été le plus fréquemment étudié et sur lequel les données sont les plus nombreuses. C'est pourquoi, en l'absence de données préexistantes et d'éléments incitant à choisir un tissu donné, le choix du foie est justifié par le fait que c'est le siège principal du

▼M7

métabolisme des xénobiotiques et qu'il est souvent fortement exposé tant aux produits chimiques initiaux qu'à leur(s) métabolite(s). Dans certains cas, l'examen d'un site de contact direct (l'estomac glandulaire ou le duodénum/jéjunum pour les produits administrés par voie orale, par exemple, ou les poumons pour les produits inhalés) peut être particulièrement indiqué. Des tissus complémentaires ou différents pourront être sélectionnés compte tenu des raisons justifiant la conduite du test, mais il peut être utile d'examiner différents tissus prélevés sur les mêmes animaux, à condition que le laboratoire ait fait la preuve de ses compétences pour ces tissus et de son aptitude à manipuler simultanément différents tissus.

Préparation des prélèvements

Pour les opérations décrites dans les paragraphes suivants (44-49), il importe que toutes les solutions ou suspensions stables soient utilisées avant leur date d'expiration, ou que des solutions ou suspensions fraîches soient préparées si nécessaire. De plus, dans ce qui suit, le temps passé à (i) prélever chaque tissu après la nécropsie, (ii) traiter chaque tissu pour obtenir des suspensions de cellules/noyaux, et (iii) traiter la suspension et préparer les lames, est considéré chaque fois comme une variable critique (voir définitions à l'appendice 1), et des durées acceptables pour chacune de ces étapes doivent avoir été fixées lors de l'établissement de la méthode et de la démonstration des compétences du laboratoire.

Les animaux seront sacrifiés conformément à la législation en vigueur sur le bien-être animal et à la règle des 3R, au(x) moment(s) approprié(s) après la dernière administration du produit chimique d'essai. Le(s) tissu(s) sélectionné(s) est/sont prélevé(s), disséqué(s), une portion est collectée pour le test des comètes et, au même moment, un échantillon de la même partie du tissu est découpé et placé dans une solution de formaldéhyde ou un fixateur approprié pour une éventuelle analyse histopathologique (voir paragraphe 55) selon les méthodes standards (12). Le tissu destiné au test des comètes est placé dans du tampon de broyage, rincé soigneusement au tampon de broyage froid pour éliminer le sang résiduel, et conservé dans du tampon de broyage glacé jusqu'au traitement. Une perfusion in situ peut aussi être pratiquée pour le foie ou les reins, par exemple.

Un grand nombre de méthodes d'isolement des cellules/noyaux ont été publiées. Elles incluent le broyage de tissus tels que ceux du foie ou des reins, le raclage de la surface des muqueuses dans le cas du tractus gastro-intestinal, l'homogénéisation et la digestion enzymatique. Les essais de validation du JaCVAM n'ont porté que sur des cellules isolées; pour l'établissement de la méthode et pour pouvoir faire référence aux essais de validation du JaCVAM lors de la démonstration des compétences, on préférera donc les cellules isolées. Cependant, il a été établi que les résultats du test ne diffèrent pas fondamentalement selon que l'on a recours à des cellules ou des noyaux isolés (8). De même, différentes méthodes d'isolement des cellules/noyaux (homogénéisation, broyage, digestion enzymatique et filtration sur tamis) ont donné des résultats comparables (55). On peut donc utiliser soit des cellules isolées soit des noyaux isolés. Le laboratoire évaluera et validera soigneusement les méthodes d'isolement des cellules/noyaux par type de tissu. Comme indiqué au paragraphe 40, la persistance de certaines des lésions conduisant à des cassures de brins d'ADN détectées par le test des comètes peut être très brève (40) (41). Quelle que soit la méthode employée pour préparer les suspensions de cellules/noyaux isolés, il importe donc que les tissus soient traités dès que possible après que les animaux ont été sacrifiés, et placés dans des conditions visant à réduire la disparition des lésions (maintien des tissus à basse température, par exemple). Il convient de conserver les suspensions cellulaires à très basse température jusqu'à ce qu'elles soient prêtes à être utilisées, afin de pouvoir mettre en évidence une variation inter-échantillons minimale et des réponses appropriées chez les témoins positifs et négatifs.

▼M7

PRÉPARATION DES LAMES

La préparation des lames doit intervenir dès que possible après la préparation des cellules/noyaux isolés (dans l'heure qui suit, idéalement), mais la température et le temps écoulé entre le sacrifice des animaux et la préparation des lames doivent être rigoureusement contrôlés et validés dans les conditions du laboratoire. Le volume de suspension cellulaire ajouté à l'agarose à bas point de fusion (habituellement de 0,5 à 1,0 %) pour préparer les lames ne doit pas réduire le pourcentage d'agarose à bas point de fusion à moins de 0,45 %. La densité optimale de cellules sera déterminée par le système d'analyse d'image utilisé pour le comptage des comètes.

Lyse

Les conditions de lyse constituent également une variable critique pouvant interférer avec les cassures de brins résultant d'un type spécifique de modifications de l'ADN (alkylations et formation d'adduits aux bases de l'ADN). Il est donc recommandé de maintenir les conditions de lyse aussi constantes que possible pour toutes les lames au cours d'une même expérimentation. Une fois préparées, les lames sont immergées dans une solution de lyse réfrigérée pendant au moins une heure (ou toute une nuit) à une température de l'ordre de 2 à 8 °C, en lumière tamisée (lumière jaune, par exemple) ou en environnement étanche à la lumière, pour éviter l'exposition à la lumière blanche, qui peut contenir des composantes UV. Après cette période d'incubation, on rince les lames pour les débarrasser du détergent et des sels résiduels avant l'étape de déroulement alcalin. On utilisera pour ce faire de l'eau purifiée, un tampon neutralisant ou un tampon phosphate. Un tampon d'électrophorèse peut également être utilisé. L'objectif est de maintenir des conditions alcalines dans la chambre d'électrophorèse.

Déroulement et électrophorèse

Les lames sont placées de façon aléatoire sur le plateau d'une unité d'électrophorèse sur gels immergés contenant suffisamment de solution d'électrophorèse pour que la surface des lames soit entièrement recouverte (la profondeur d'immersion doit, elle aussi, être cohérente d'une épreuve à l'autre). Dans un autre type d'unité d'électrophorèse utilisé pour le test des comètes, c'est-à-dire avec refroidissement actif, circulation du liquide de refroidissement et alimentation haute tension, l'intensité du courant électrique sera d'autant plus forte que la hauteur de solution sera élevée, à tension constante. Les lames doivent être réparties de façon équilibrée dans la cuve d'électrophorèse afin d'atténuer les effets d'éventuelles tendances ou les effets de bord dans la cuve et de limiter les variations entre lots; il faut donc que pour chaque épreuve d'électrophorèse, on utilise le même nombre de lames provenant de chaque animal, et des échantillons des différents groupes de doses, des témoins négatifs et des témoins positifs. Les lames doivent rester au moins 20 minutes dans la cuve pour que l'ADN se déroule, puis sont soumises à l'électrophorèse dans des conditions contrôlées assurant une sensibilité et une plage dynamique maximales pour l'essai (c'est-à-dire garantissant des pourcentages d'ADN de queue acceptables, chez les témoins négatifs et positifs, pour assurer une sensibilité maximale). Le degré de migration de l'ADN est proportionnel à la durée de l'électrophorèse, ainsi qu'au potentiel (V/cm). D'après les essais du JaCVAM, celui-ci pourrait être de 0,7 V/cm pendant au moins 20 minutes. La durée de l'électrophorèse est considérée comme une variable critique et le temps d'électrophorèse doit être réglé de façon à optimiser la plage dynamique. Des durées plus longues (30 ou 40 minutes, par exemple, pour gagner en sensibilité) se traduisent habituellement par des réponses positives plus nettes pour des mutagènes connus. Cependant, un allongement de la durée de l'électrophorèse peut aussi se traduire par une migration excessive dans les échantillons témoins. Chaque expérience doit être réalisée à tension constante, et la variabilité des autres paramètres doit se situer dans une plage étroite et spécifiée, par exemple, dans les essais du JaCVAM, 0,7 V/cm avec une intensité initiale de 300 mA. La profondeur du tampon doit être ajustée pour réaliser les conditions requises, et maintenue tout au long de l'expérimentation. Il convient de consigner l'intensité du courant au début et à la

▼M7

fin de l'électrophorèse. Les conditions optimales doivent donc être déterminées au cours de la démonstration initiale de compétences par le laboratoire pour chaque tissu étudié. La température de la solution d'électrophorèse au cours du déroulement et de l'électrophorèse doit être maintenue à un niveau bas (2-10 °C, habituellement) (10). Il convient de consigner la température de la solution d'électrophorèse au début du déroulement, au début de l'électrophorèse et à la fin de l'électrophorèse.

Une fois l'électrophorèse terminée, les lames doivent être immergées/rincées dans le tampon de neutralisation pendant au moins 5 minutes. Les gels peuvent être colorés et observés à l'état «frais» (pendant 1 à 2 jours, par exemple) ou être déshydratés et observés ultérieurement (dans un délai de une à deux semaines après la coloration, par exemple) (56). Cependant, ces conditions doivent être validées lors de la démonstration de compétences et les données historiques doivent être recueillies et conservées séparément pour chacune de ces options. Dans le second cas, les lames doivent être déshydratées par immersion dans l'éthanol absolu pendant au moins cinq minutes, séchées à l'air libre puis stockées, soit à température ambiante, soit dans un récipient conservé au réfrigérateur jusqu'à la lecture.

Méthodes de mesure

L'évaluation quantitative des comètes fait appel à un système d'analyse d'image automatique ou semi-automatique. Les lames sont colorées par un colorant fluorescent approprié — SYBR Gold, Green I, iodure de propidium ou bromure d'éthidium, par exemple — et observées à un grossissement approprié (200x, par exemple) au microscope à épifluorescence équipé de détecteurs appropriés ou d'une caméra numérique (CCD, par exemple).

Les cellules peuvent être classées en trois catégories décrites dans l'atlas des images de comètes (57), à savoir mesurable, non mesurable, cellule fantôme (voir le paragraphe 55 pour plus de précisions). Seules les cellules mesurables (tête et queue clairement définies, pas d'interférence avec les cellules voisines) doivent être classées en fonction du pourcentage d'ADN de queue, pour éviter les artefacts. Il n'est pas nécessaire d'indiquer la fréquence des cellules non mesurables. La fréquence des cellules fantômes est évaluée par un examen visuel (l'absence de tête clairement définie ayant pour conséquence que ces cellules ne sont pas bien détectées par le système d'analyse d'image) portant sur au moins 150 cellules par échantillon (voir paragraphe 56 pour plus de précisions) et mentionnée à part.

Toutes les lames, y compris celles des témoins négatifs et positifs, doivent être codées indépendamment et évaluées «en aveugle», afin que l'analyste ignore à quel traitement elles correspondent. Pour chaque échantillon (par tissu et par animal), au moins 150 cellules (en dehors des cellules fantômes — voir paragraphe 56) doivent être analysées. L'évaluation de 150 cellules par animal chez au moins 5 animaux par dose (mais moins de 5 dans le groupe témoin positif concomitant — voir paragraphe 29) assure une puissance statistique satisfaisante, selon l'analyse de Smith *et al.*, 2008 (5). Si des lames sont utilisées, cela peut représenter l'évaluation de 2 ou 3 lames par échantillon pour des groupes de 5 animaux. Plusieurs zones de la lame doivent être observées à une densité garantissant l'absence de chevauchement des queues. L'évaluation en bord de lame est à éviter.

Les cassures de brins d'ADN dans le test des comètes peuvent être mesurées selon divers paramètres indépendants, tels que le pourcentage d'ADN de queue, la longueur de la queue ou le moment de la queue. Ces trois mesures peuvent être effectuées si l'on utilise un logiciel d'analyse d'image approprié. Cependant, le pourcentage d'ADN de queue (également appelé intensité de la queue) est recommandé pour l'évaluation et l'interprétation des résultats (12) (40) (41) (42); il est déterminé par l'intensité des fragments d'ADN présents dans la queue, exprimée en pourcentage de l'intensité totale de la cellule (13).

▼M7

Lésion des tissus et cytotoxicité

Des résultats positifs au test des comètes peuvent ne pas être dus exclusivement à la génotoxicité, la toxicité pour les tissus cibles pouvant aussi se traduire par une augmentation de la migration de l'ADN (12) (41). A l'inverse, une cytotoxicité faible ou modérée est souvent observée dans le cas des substances génotoxiques connues (12); le test des comètes ne permet donc pas à lui seul de distinguer une migration de l'ADN induite par la génotoxicité d'une migration induite par la cytotoxicité. Toutefois, lorsqu'une augmentation de la migration de l'ADN est observée, il est recommandé d'étudier au moins un indicateur de cytotoxicité, ce qui peut aider à interpréter les résultats. Une augmentation de la migration de l'ADN en présence d'éléments attestant clairement de la cytotoxicité d'un produit doit être interprétée avec prudence.

De nombreux critères de cytotoxicité ont été proposés et parmi eux, les altérations histopathologiques sont considérées comme fournissant une bonne évaluation de la toxicité tissulaire. Des observations telles qu'une inflammation, une infiltration cellulaire ou des modifications apoptotiques ou nécrotiques ont été associées à une augmentation de la migration de l'ADN; cependant, comme l'ont montré les essais de validation du JaCVAM (12), il n'existe pas de liste définitive de modifications histopathologiques systématiquement associées à une migration accrue de l'ADN. Les modifications de certains paramètres biologiques (AST, ALT, par exemple) peuvent aussi fournir des informations utiles sur les lésions des tissus, et d'autres indicateurs, tels que l'activation des caspases, le marquage des cellules apoptotiques par la méthode TUNEL, la coloration à l'annexine V, etc., peuvent aussi être envisagés. Cependant, les données publiées sur l'utilisation de ces indicateurs dans des études *in vivo* sont limitées et ne sont peut-être pas toutes également fiables.

Les cellules fantômes sont des cellules dont l'image au microscope consiste en une tête de petite taille ou inexistante et une grande queue diffuse, et qui sont considérées comme très endommagées, bien que l'étiologie de ce phénomène soit incertaine (voir appendice 3). Du fait de leur apparence, la mesure du pourcentage d'ADN dans la queue par analyse d'image n'est pas fiable, et il convient donc de les évaluer séparément. L'occurrence de cellules fantômes doit être consignée et signalée, et toute augmentation importante de leur nombre attribuée au produit chimique testé doit être investiguée et interprétée avec soin. La connaissance du mode d'action potentiel des produits chimiques d'essai peut constituer une aide à cet égard.

RESULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

L'animal étant l'unité expérimentale, il convient de présenter sous forme de tableau les données animales individuelles et la synthèse des résultats. Du fait de la nature hiérarchique des données, il est recommandé de déterminer pour chaque lame le pourcentage médian d'ADN de queue et de calculer pour chaque animal la moyenne des médianes (12). La moyenne d'un groupe est obtenue en faisant la moyenne des moyennes individuelles des animaux qui le composent. Toutes ces valeurs doivent figurer dans le rapport. D'autres démarches peuvent être appliquées (voir paragraphe 53) si cela est justifié d'un point de vue scientifique et statistique. Pour l'analyse statistique, diverses approches sont possibles (58) (59) (60) (61). Lors du choix des méthodes statistiques, on tiendra compte de la nécessité de transformer éventuellement les données (en logarithmes ou en racines carrées, par exemple) et/ou d'ajouter un petit nombre (0.001, par exemple) à toutes les valeurs (même non nulles) pour atténuer l'incidence des valeurs nulles, comme il est expliqué dans les références ci-dessus. On trouvera à l'appendice 2 des précisions sur l'analyse des interactions traitement/sexe lorsque des animaux des deux sexes sont utilisés, et sur l'analyse subséquente des données selon que des différences sont observées ou non. Des données sur la toxicité et les signes cliniques doivent également figurer dans le rapport.

Critères d'acceptabilité

L'acceptation de l'essai repose sur les critères suivants:

a. Les données relatives aux témoins négatifs concomitants sont considérées comme pouvant être ajoutées à la base de données des témoins négatifs historiques du laboratoire (voir paragraphe 16).

▼M7

b. Les témoins positifs concomitants (voir paragraphe 29) doivent induire des réponses compatibles avec celles générées dans la base de données des témoins positifs historiques et produire une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant.

c. Un nombre adéquat de cellules et de doses ont été analysées (paragraphes 52 et 36-38).

d. Les critères de sélection de la dose la plus élevée sont cohérents avec ceux décrits au paragraphe 36.

Évaluation et interpretation des résultats

À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si:

a. au moins une des doses d'essai présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant,

b. un test de tendance approprié montre que l'augmentation est liée à la dose,

c. des résultats se situent à l'extérieur de la distribution des données des témoins négatifs historiques pour une espèce, un véhicule, une voie, un tissu et un nombre d'administrations donnés.

Lorsque tous ces critères sont remplis, le produit chimique d'essai est considéré comme capable d'induire des cassures de brins d'ADN dans les tissus étudiés dans ce système d'essai. Si un ou deux seulement de ces critères sont remplis, voir le paragraphe 62.

À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si:

a. aucune concentration d'essai ne présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concurrent,

b. un test de tendance approprié montre qu'il n'y a pas d'augmentation liée à la concentration,

c. l'intégralité des résultats se situe à l'intérieur de la distribution des données des témoins négatifs historiques pour une espèce, un véhicule, une voie, un tissu et un nombre d'administrations donnés,

d. une preuve directe ou indirecte de l'exposition du/des tissu(s) cible(s) ou de la toxicité pour ce(s) tissu(s) est apportée.

Le produit chimique d'essai est alors considéré comme incapable d'induire des cassures de brins d'ADN dans les tissus étudiés dans ce système d'essai.

Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse clairement positive ou négative.

Lorsque la réponse n'est ni clairement négative ni clairement positive (c'est-à-dire que tous les critères des paragraphes 59 ou 60 ne sont pas remplis) et afin d'établir la signification biologique d'un résultat, les données doivent être soumises à un jugement d'expert et/ou des investigations plus poussées si cela est justifié d'un point de vue scientifique. Il peut être utile d'examiner des cellules supplémentaires (le cas échéant) ou de répéter l'expérience, éventuellement dans des conditions expérimentales optimisées (espacement des doses, autres voies d'administration, autres moments d'échantillonnage ou autres tissus, par exemple).

Dans de rares cas, même après des études complémentaires, l'ensemble de données ne permettra pas de conclure à un résultat positif ou négatif, et le résultat sera déclaré équivoque.

▼M7

Pour évaluer la signification biologique d'un résultat positif ou équivoque, des informations sur la cytotoxicité pour le tissu cible sont nécessaires (voir paragraphes 54-55). Lorsque des résultats positifs ou équivoques sont observés uniquement en présence de signes clairs de cytotoxicité, on conclura à une étude équivoque pour ce qui est de la génotoxicité, à moins de disposer d'informations suffisantes pour permettre une conclusion définitive. En cas de résultats négatifs s'accompagnant de signes de toxicité à toutes les doses, il peut être judicieux de procéder à une étude complémentaire à des doses non toxiques.

Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Produit chimique d'essai:

— source, numéro de lot s'il est disponible;

— stabilité du produit chimique d'essai, date limite d'utilisation, ou date de réanalyse, si elle est connue.

Substance mono-constituant:

— apparence physique, hydro-solubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude;

— identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges:

— caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants.

Solvant/véhicule:

— justification du choix du solvant/véhicule;

— solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues;

— préparation des formulations à administrer;

— déterminations analytiques sur les formulations (stabilité, homogénéité, concentrations nominales, par exemple).

Animaux d'essai:

— espèce/souche utilisée et justifications scientifiques et éthiques;

— nombre, âge et sexe des animaux;

— source, conditions d'encagement, régime alimentaire, enrichissement environnemental, etc.;

— poids individuel des animaux au début et à la fin de l'essai, y compris fourchette, moyenne et écart type pour chaque groupe.

Conditions de l'essai:

— données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule);

▼**M7**

— résultats de l'étude de détermination des doses (le cas échéant);

— justification du choix des doses;

— détails sur la préparation du produit chimique d'essai;

— détails sur l'administration du produit chimique d'essai;

— justification de la voie d'administration;

— site d'injection (pour les études par voie sous-cutanée ou intraveineuse);

— méthodes de préparation des échantillons, analyses histopathologiques le cas échéant, en particulier pour les produits chimiques donnant un résultat positif au test des comètes;

— justification de la sélection du tissu;

— méthodes permettant de vérifier que le produit chimique d'essai a atteint le tissu cible ou la circulation sanguine en cas de résultats négatifs;

— dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour) calculée en fonction de la concentration du produit chimique d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson (ppm) et de la consommation, s'il y a lieu;

— détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau;

— description détaillée des programmes de traitement et d'échantillonnage et justification des choix (données toxicocinétiques éventuelles, par exemple);

— méthode d'analgésie;

— méthode employée pour sacrifier les animaux;

— procédures d'isolement et de conservation des tissus;

— méthodes de préparation de la suspension de cellules/noyaux isolés;

— source et numéros de lots de tous les réactifs (lorsque c'est possible);

— méthodes d'évaluation de la cytotoxicité;

— conditions d'électrophorèse;

— techniques de coloration utilisées;

— méthodes de comptage et de mesurage des comètes.

Résultats:

— Observations cliniques générales, s'il y a lieu, avant et pendant toute la durée de l'essai pour chaque animal;

— données établissant la cytotoxicité, le cas échéant;

▼M7

— pour les études d'une durée supérieure à une semaine: évolution du poids corporel de chaque animal au cours de l'étude, y compris l'intervalle des poids, la moyenne et l'écart type pour chaque groupe; nourriture consommée;

— relation dose-réponse, le cas échéant;

— pour chaque tissu/animal, pourcentage d'ADN de queue (ou autre donnée, selon le paramètre choisi), valeurs médianes par lame, valeurs moyennes par animal et valeurs moyennes par groupe;

— données relatives aux témoins négatifs concomitants et aux témoins négatifs historiques, avec plages de valeurs, moyennes/médianes et écarts-types pour chaque tissu évalué;

— données relatives aux témoins positifs concomitants et aux témoins positifs historiques;

— pour les tissus autres que le foie, courbe dose-réponse correspondant au témoin positif. Cette courbe peut être établie à partir des données collectées au cours de l'établissement des compétences du laboratoire (voir paragraphes 16-17) et sera accompagnée d'une justification, avec des références à la littérature actuelle, montrant que l'ampleur et la dispersion des réponses aux témoins dans le tissu étudié sont appropriées;

— analyses et méthodes statistiques employées; critères appliqués pour considérer une réponse comme positive, négative ou équivoque;

— fréquence des cellules fantômes dans chaque groupe et par animal.

Discussion des résultats

Conclusions

Références

BIBLIOGRAPHIE

(1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, Vol. 654/2, pp. 114-32.

(2) Brendler-Schwaab, S. et al. (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, pp. 245-54.

(3) Burlinson, B. et al. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, pp. 31-5.

(4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 143-63.

(5) Smith, C.C, et al. (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 233-40.

(6) Hartmann, A. et al. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, pp. 45-51.

(7) McKelvey-Martin, V.J. et al (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, pp. 47-63.

(8) Tice, R.R. et al. (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 206-21.

▼M7

(9) Singh, N.P. et al. (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, pp. 184-91.

(10) Rothfuss, A. et al. (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, pp. 40-69.

(11) OCDE (2016), «Overview of the set of OECD Genetic Toxicity Test Guidelines and updates performed in 2014-2015». Publications ENV. Série sur les essais et l'évaluation n° 234, OCDE, Paris.

(12) OCDE (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Série sur les essais et l'évaluation n°°195 et 196, OCDE, Paris.

(13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the «Comet» assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, pp. 86-94.

(14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, pp. 207-14.

(15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, pp. 249-61.

(16) Rothfuss, A. et al. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108-20.

(17) Kushwaha, S. et al. (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, pp. 145–54.

(18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 187-99.

(19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, pp. 7-19.

(20) Recio, L. et al. (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, pp. 149-62.

(21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 621-3.

(22) Hartmann, A. (2004), Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations, *Mutagenesis*, Vol. 19/1, pp. 51-9.

(23) Nesslany, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, pp. 28-41.

(24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 393/1-2, pp. 175-8.

▼**M7**

(25) Toyoizumi, T. et al. (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, pp. 175-80.

(26) Struwe, M. et al. (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, pp. 240-9.

(27) Wada, K. et al. (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, pp. 26-30.

(28) Wang, A. et al. (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, pp. 51-9.

(29) Burlinson, B. et al. (2007), *In Vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 31-5.

(30) Jackson, P. et al. (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, pp. 486-500.

(31) Sasaki, Y.F. et al. (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, pp. 629-799.

(32) Sekihashi, K. et al. (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 53-74.

(33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity, *Mutation Research*, Vol. 681/1, pp. 3-12.

(34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, pp. 275-282.

(35) Cordelli, E. et al. (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, pp. 443-451.

(36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, pp. 167-72.

(37) Pfuhler, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 196-201.

(38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 165-81.

(39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, pp. 267-282.

▼M7

(40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605(1-2), pp. 7-16.

(41) Burlinson, B.et al. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol.627/1, pp. 31-5.

(42) Kumaravel, T.S. et al. (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, pp. 53-64.

(43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, pp. 689-95.

(44) Møller, P. et al. (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 109-11.

(45) Forchhammer, L. et al. (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 113-23.

(46) Azqueta, A. et al. (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, pp. 41-45.

(47) Hayashi, M. et al. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* John Wiley and Sons, New York 2nd ed.

(49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123).

(50) Chapitre B.8 de la présente annexe: Toxicité subaiguë par inhalation: étude sur 28 jours.

(51) Chapitre B.29 de la présente annexe: Toxicité subchronique par inhalation: étude sur 90 jours.

(52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, Mutation Research, Vol. 140/2-3, pp. 141-45.

(53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, pp. 35-41

(54) OCDE (2002), «Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation», Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 19, OCDE, Paris.

(55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, pp. 50-4.

(56) Hartmann, A. et al. (2003), Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, pp.45–51.

(57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.

(58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, pp. 109-19.

▼**M7**

(59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 167-75.

(60) Bright, J. et al. (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, pp. 485-93.

(61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 171-82.

▼**M7**

Appendice 1

DEFINITIONS

Comète: nom donné à la forme que prennent les nucléoïdes soumis à un champ électrophorétique, en raison de sa similitude avec celle d'une comète: la tête correspond au noyau, et la queue est constituée de l'ADN migrant hors du noyau sous l'action du champ électrique.

Électrophorèse de cellules isolées en gel d'agarose en conditions alcalines: technique sensible pour la détection de lésions primaires de l'ADN au niveau de cellules/noyaux individualisés.

Intensité de la queue ou pourcentage d'AND de queue: correspond à l'intensité de fluorescence de la queue de la comète rapportée à l'intensité totale (tête plus queue). Reflète l'ampleur des cassures de l'ADN, exprimée sous forme de pourcentage.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

UVCB: Substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques.

Variable/paramètre critique: désigne une variable d'un protocole expérimental dont une modification mineure peut avoir une forte incidence sur la conclusion de l'essai. Les variables critiques peuvent être spécifiques d'un tissu. Il importe de ne pas modifier les variables critiques, particulièrement en cours d'essai, sans tenir compte de l'incidence de ces modifications sur la réponse à l'essai, signalée par exemple par l'ampleur et la variabilité de la réponse des témoins positifs et négatifs. Le rapport d'essai doit préciser les modifications apportées aux variables critiques au cours de l'essai, ou par rapport au protocole standard du laboratoire, et justifier chacune de ces modifications.

▼M7

Appendice 2

PLAN FACTORIEL UTILISÉ POUR IDENTIFIER DES DIFFÉRENCES ENTRE SEXES DANS LE TEST DES COMÈTES IN VIVO

Le plan factoriel et son analyse

Selon cette démarche, un minimum de 5 mâles et de 5 femelles sont exposés à chaque concentration d'essai, ce qui conduit à utiliser un minimum de 40 animaux (20 mâles et 20 femelles, auxquels s'ajoutent les témoins positifs nécessaires)

La démarche décrite ici, qui correspond à l'une des formes simples du plan factoriel, équivaut à une analyse de variance à deux facteurs, dans laquelle le sexe et la concentration sont les facteurs principaux. Les données peuvent être analysées à l'aide de nombreux progiciels statistiques standard tels que SPSS, SAS, STATA ou Genstat, ou en utilisant le logiciel R.

À partir de l'ensemble de données, on détermine la variabilité entre les sexes, la variabilité entre les concentrations et la variabilité liée à l'interaction entre sexe et concentrations. Chacun de ces termes est comparé à une estimation de la variabilité entre les animaux répartis au sein des groupes d'animaux de même sexe exposés à la même concentration. On trouvera plus de précisions sur cette méthode dans les manuels de statistiques classiques (voir les références) et dans les fichiers d'aide fournis avec les logiciels statistiques.

On examine ensuite le terme d'interaction sexe x concentration dans un tableau ANOVA ([1]). En l'absence de terme d'interaction significatif, la combinaison des valeurs inter-sexes ou inter-niveaux de concentration permet de réaliser des tests statistiques valides entre les niveaux, en se basant sur le terme de variabilité intra-groupe combinée fourni par l'ANOVA.

L'analyse se poursuit par la partition de la variabilité estimée entre concentrations, de façon à obtenir des contrastes, ce qui permet d'établir les contrastes linéaires et quadratiques des réponses pour l'ensemble des niveaux de concentration. Lorsqu'il y a une interaction significative sexe x concentration, ce terme peut à son tour être partitionné en contrastes d'interaction linéaire x sexe et quadratique x sexe. Ces termes permettent de vérifier si les réponses aux concentrations sont parallèles pour les deux sexes ou si elles diffèrent selon le sexe.

L'estimation de la variabilité intra-groupe combinée peut servir à tester l'écart entre les moyennes en les comparant deux à deux. Ces comparaisons peuvent se faire entre les moyennes pour les deux sexes et entre les moyennes pour les différents niveaux de concentration (comparaisons avec les témoins négatifs, par exemple). En cas d'interaction significative, des comparaisons peuvent être faites entre les moyennes des différentes concentrations pour un même sexe, ou entre les moyennes des deux sexes à la même concentration.

Références

De nombreux manuels de statistiques traitent de la théorie, de la conception, de la méthodologie, de l'analyse et de l'interprétation des plans factoriels, depuis les analyses les plus simples, à deux facteurs, jusqu'aux formes complexes utilisées dans la conception de l'expérimentation. La liste ci-dessous n'est pas exhaustive. Certains ouvrages comportent des exemples d'application de ce type de démarches, accompagnés parfois d'un code permettant l'exécution des analyses sous différents logiciels.

([1]) Les statisticiens qui suivent une démarche de modélisation telle que l'utilisation de modèles linéaires généralisés (MLG) peuvent conduire l'analyse d'une manière différente mais comparable; toutefois, ils n'obtiendront pas nécessairement le traditionnel tableau ANOVA, qui remonte à des conceptions algorithmiques du calcul statistique développées à l'ère pré-informatique.

▼**M7**

(1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

(2) Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

(3) Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

(4) Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

(5) Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

(6) Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

(7) Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

Appendice 3

LIMITES ACTUELLES DE L'ESSAI

Le test des comètes in vivo présente plusieurs limites liées à l'état actuel des connaissances. On peut s'attendre à ce que leur nombre diminue à l'avenir, ou à ce qu'elles soient définies de façon plus précise, à mesure que l'expérience acquise dans l'application du test apporte des réponses aux questions de sécurité, dans un contexte réglementaire.

1. Certains types de dommages à l'ADN peuvent être de courte durée, c'est-à-dire réparés trop rapidement pour être observables 24 heures ou plus après la dernière dose administrée. Il n'existe pas de liste validée des dommages de courte durée, ni des produits chimiques susceptibles de provoquer ce type de dommages, et l'on ignore combien de temps ces derniers restent détectables. Le moment d'échantillonnage optimal peut aussi être spécifique du produit chimique ou de la voie d'administration, et les moments d'échantillonnage doivent être établis d'après les données cinétiques (temps T_{max} auquel est atteint le pic de concentration dans le plasma ou le tissu, par exemple), lorsque ces données sont disponibles. La plupart des études de validation sur lesquelles s'appuie la présente méthode d'essai précise que la nécropsie doit intervenir 2 ou 3 heures après l'administration de la dernière dose. La plupart des études publiées font état d'une administration de la dernière dose de 2 à 6 heures avant le sacrifice des animaux. C'est donc sur ces bases que la présente méthode d'essai recommande d'administrer la dose finale à un moment spécifié entre 2 et 6 heures avant la nécropsie, sauf si des données incitent à procéder différemment.

2. Il n'existe pas de données validées relatives à la sensibilité du test pour la détection des dommages de courte durée à l'ADN consécutifs à l'administration dans les aliments ou l'eau de boisson, par comparaison avec l'administration par gavage. Des dommages à l'ADN ont été détectés après administration dans les aliments ou l'eau de boisson, mais les rapports d'essais réalisés par cette voie d'administration sont relativement peu nombreux, et l'on dispose d'une expérience beaucoup plus grande de l'administration par gavage ou par voie intrapéritonéale. La sensibilité du test pourrait donc être réduite dans le cas des produits chimiques induisant des dommages de courte durée, lorsque ces produits sont administrées dans les aliments ou l'eau de boisson.

3. Aucune étude interlaboratoires n'a été menée sur des tissus autres que le foie et l'estomac, et aucune recommandation n'a donc été établie sur la façon d'obtenir une réponse sensible et reproductible sur des tissus autres que le foie, avec par exemple les plages attendues pour les témoins positifs et négatifs. Pour le foie, il n'a pas non plus été possible de parvenir à un accord sur un abaissement de la limite pour les témoins négatifs.

4. Bien que plusieurs publications démontrent que la cytotoxicité *in vitro* constitue un facteur de confusion, très peu de données *in vivo* ont été publiées et il n'a donc pas été possible de recommander une mesure de cytotoxicité particulière. Des modifications histopathologiques telles qu'une inflammation, une infiltration cellulaire ou des modifications apoptotiques ou nécrotiques ont été associées à une augmentation de la migration de l'ADN; cependant, comme l'ont montré les essais de validation du JaCVAM (OCDE, 2014), ces modifications ne s'accompagnent pas toujours de résultats positifs dans le test des comètes et, de ce fait, il n'existe pas de liste définitive de modifications histopathologiques systématiquement associées à une migration accrue de l'ADN. Il a été suggéré d'utiliser les cellules fantômes comme indicateur de cytotoxicité, mais leur étiologie est incertaine. Selon certaines données, elles pourraient résulter de la cytotoxicité des produits chimiques, de dommages mécaniques/à induction enzymatique déclenchés lors de la préparation des échantillons (Guerard *et al.*, 2014) et/ou d'un effet extrême de la génotoxicité du produit chimique testé. D'autres données semblent indiquer qu'elles sont dues à des dommages importants mais peut-être réparables de l'ADN (Lorenzo *et al.*, 2013).

▼**M7**

5. La possibilité a été établie de congeler des tissus ou des noyaux cellulaires pour les analyser ultérieurement. Cela se traduit généralement par un effet mesurable sur la réponse au véhicule et au témoin positif (Recio *et al.*, 2010; Recio *et al.*, 2012. Jackson *et al.*, 2013). Si le laboratoire a recours à cette pratique, il doit démontrer sa compétence en matière de congélation, et confirmer que les valeurs du pourcentage d'ADN de queue dans les tissus cibles des animaux traités par le véhicule sont suffisamment basses et que des réponses positives peuvent encore être détectées. La littérature décrit plusieurs méthodes de congélation des tissues. Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe pas d'accord sur la meilleure façon de congeler et décongeler les tissus ni comment évaluer si une réponse potentiellement altérée peut affectent la sensibilité de l'essai.

6. Des travaux récents montrent que l'on peut s'attendre à ce que le nombre de variables critiques continue de baisser et à ce que les paramètres relatifs à ces variables soient définis plus précisément (Guerard *et al*., 2014).

Références

(1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, pp. 114-21.

(2) Jackson, P. *et al*. (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 699-707.

(3) Lorenzo,Y. *et al*. (2013), The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, pp. 427-32.

(4) OCDE (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Série sur les essais et l'évaluation, n° 196 et 195, OCDE, Paris.

(5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149-62.

(6) Recio, L. *et al*. (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101-13.

▼M8

B.63. ESSAI DE DÉPISTAGE DE LA TOXICITÉ POUR LA REPRODUCTION ET LE DÉVELOPPEMENT

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 421 (2016) de l'OCDE. Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement mises à jour pour tenir compte des progrès scientifiques. La ligne directrice 421 originale a été adoptée en 1995, sur la base d'un protocole pour un «essai préliminaire de dépistage de la toxicité pour la reproduction», examiné lors de deux réunions d'experts, à Londres en 1990 (1) et à Tokyo en 1992 (2).

2. La présente méthode d'essai a été mise à jour en y introduisant des paramètres pertinents pour la détection des perturbateurs endocriniens, suite à une activité prioritaire lancée par l'OCDE en 1998, destinée à réviser les lignes directrices existantes et à en élaborer de nouvelles pour les essais et le dépistage des perturbateurs endocriniens (3). La ligne directrice 407 de l'OCDE (Étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs, Chapitre B.7 de la présente annexe), par exemple, a été mise à jour en 2008 en y introduisant des paramètres capables de détecter l'activité endocrinienne des produits chimiques d'essai. L'objectif de la mise à jour de la ligne directrice 421 était d'inclure des paramètres pertinents pour l'étude des perturbateurs endocriniens dans des lignes directrices de dépistage au cours desquelles les périodes d'exposition couvrent certaines périodes sensibles du développement (périodes prénatale ou suivant la naissance).

3. Les paramètres pertinents pour la détection des perturbateurs endocriniens qui ont été sélectionnés et ajoutés, font aussi partie de la ligne directrice 443 (Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération, Chapitre B.56 de la présente annexe); ils ont été introduits dans la ligne directrice 421 sur la base d'une étude de faisabilité étudiant les questions scientifiques et techniques liées à l'inclusion de ces paramètres, ainsi que les ajustements possibles à mettre en œuvre dans la conception de l'essai pour permettre leur inclusion (4).

4. La présente méthode d'essai vise l'obtention d'informations sommaires concernant les effets d'un produit chimique d'essai sur le fonctionnement de la reproduction chez le mâle et la femelle, notamment la fonction gonadique, le comportement lors de l'accouplement, la conception, le développement de l'embryon et la parturition. Elle ne vient pas en remplacement des méthodes d'essai existantes B.31, B.34, B.35 ou B.36.

CONSIDERATIONS PRELIMINAIRES

5. La présente méthode d'essai peut être appliquée en vue d'obtenir une première série d'informations concernant les effets possibles d'une substance sur la reproduction et/ou sur le développement, soit au stade initial d'une évaluation toxicologique soit dans l'évaluation d'une substance particulièrement préoccupante. Elle peut avoir son utilité dans un ensemble d'essais de tri initial de produits chimiques existants pour lesquels les informations toxicologiques sont peu nombreuses ou absentes et peut donner des indications sur l'éventail de doses à utiliser dans des études plus complètes des effets sur la reproduction ou le développement. L'utilisation de cette ligne directrice peut être justifiée dans d'autres cas. Lors de la réalisation de l'étude, il est recommandé de suivre les principes et considérations énoncés dans le document d'orientation n° 19 de l'OCDE sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques en tant qu'effets mesurés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité (5).

▼M8

6. Cette méthode d'essai ne permet pas d'obtenir des informations complètes sur tous les aspects de la reproduction et du développement. En particulier, il n'offre qu'un moyen partiel de détecter des manifestations post-natales liées à des expositions prénatales ou des effets éventuellement liés à une exposition post-natale. Étant donné (entre autres raisons) le nombre relativement faible d'animaux dans les groupes, la sélection des effets observés retenue et la brièveté de l'étude, cette méthode ne fournit pas toute l'évidence nécessaire à l'étayage d'une conclusion définitive quant à une absence d'effets. De plus, en l'absence de données tirées d'autres essais de toxicité pour la reproduction et le développement, des résultats positifs sont utiles à une évaluation initiale du danger et permettent de juger de la nécessité de procéder à d'autres essais et de définir le calendrier de ceux-ci.

7. Les résultats obtenus concernant les paramètres endocriniens devraient être interprétés à la lumière du «Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des produits chimiques perturbant le système endocrinien» (6). La ligne directrice 421 mise à jour fait partie du niveau 4 de ce cadre conceptuel en tant qu'essai *in vivo* apportant des données sur les effets adverses affectant les paramètres endocriniens pertinents. Un signal endocrinien ne sera néanmoins pas toujours considéré comme une preuve suffisante en tant que telle que le produit chimique d'essai est un perturbateur endocrinien.

8. Dans la présente méthode d'essai, le produit chimique d'essai est censé être administré par voie orale. Des modifications peuvent s'avérer indispensables si d'autres voies d'administration sont retenues.

9. Avant d'utiliser la méthode d'essai sur un mélange pour générer des données avec pour objectif recherché l'application réglementaire, on considérera si, et si oui pourquoi, elle peut fournir des résultats adéquats dans cet objectif. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé.

10. Les définitions employées figurent dans l'appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

11. Le produit chimique d'essai est administré à des doses graduées à plusieurs groupes de mâles et de femelles. Les mâles doivent recevoir le produit chimique pendant un minimum de quatre semaines y compris le jour précédant le sacrifice, soit un minimum de deux semaines avant l'accouplement, pendant la période d'accouplement et environ deux semaines après l'accouplement. Compte tenu de la période limitée d'administration chez les mâles avant l'accouplement, la fertilité n'est pas nécessairement un indicateur précis de la toxicité testiculaire. Il faut donc procéder à un examen histologique détaillé des testicules. Compte tenu de la période d'administration de deux semaines préalable à l'accouplement, suivie d'observations concernant l'accouplement et la fertilité, et du fait que la substance est administrée au total pendant au moins quatre semaines suivies par un examen histopathologique détaillé des gonades mâles, on juge que les conditions sont suffisantes pour permettre de détecter la plupart des effets sur la fertilité mâle et la spermatogénèse.

12. Le produit chimique d'essai doit être administré aux femelles tout au long de l'étude. Celle-ci couvre deux semaines préalables à l'accouplement (de manière à englober au moins deux cycles œstraux complets), la durée variable qui précède la conception, la période de gestation et au moins treize jours après la parturition, y compris le jour précédant celui prévu pour le sacrifice.

13. La durée de l'étude, après acclimatation et évaluation du cycle œstral préalable au traitement, dépend du comportement de la femelle et s'étend sur environ 63 jours (14 jours avant l'accouplement, un maximum de 14 jours pour l'accouplement, 22 jours de gestation, 13 jours de lactation).

▼M8

14. Pendant la période d'administration, les animaux font l'objet d'une observation quotidienne rigoureuse visant à détecter les signes de toxicité. Les animaux qui périssent ou sont sacrifiés au cours de l'essai sont soumis à une autopsie; à la fin de l'essai, les animaux survivants sont sacrifiés et autopsiés.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Choix des espèces

15. La présente méthode d'essai vise les essais sur le rat. Si les paramètres spécifiés dans la présente méthode d'essai sont examinés chez une autre espèce de rongeur, une justification détaillée sera donnée. Dans le programme international de validation pour la détection des perturbateurs endocriniens de la ligne directrice 407 de l'OCDE (correspondant au chapitre B.7 de la présente annexe), le rat était la seule espèce utilisée. Les souches présentant un faible taux de fécondité ou une fréquence élevée d'anomalies du développement sont à éviter. Il convient d'employer des animaux vierges et sains, sur lesquels aucune expérience n'a été précédemment réalisée. Les animaux soumis à l'essai doivent être caractérisés comme suit: espèce, souche, sexe, poids et âge. Au début de l'étude, les différences de poids entre les animaux utilisés doivent être minimales et ne pas excéder ± 20 % de la moyenne du poids pour chaque sexe. Lorsque l'essai est conduit à titre d'étude préliminaire à une étude de toxicité à long terme ou une étude portant sur une génération complète, il est préférable d'utiliser des animaux issus de la même souche et de la même source dans les deux études.

Conditions d'encagement et d'alimentation

16. Toutes les procédures se conformeront aux normes locales en vigueur en matière de protection des animaux de laboratoire. La température de l'animalerie doit être de 22 °C (+ 3 °C). Idéalement l'humidité relative devrait être comprise entre 50 et 60 %. Elle devrait être au moins égale à 30 % et ne pas dépasser 70 %, sauf lors des opérations de nettoyage du local. Un éclairage artificiel doit être dispensé pour obtenir une photopériode de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. L'alimentation pourra comporter une nourriture classique de laboratoire et de l'eau à satiété. Le choix du régime alimentaire peut être dicté par la nécessité d'assurer un mélange satisfaisant du produit chimique d'essai lorsque celui-ci est administré par le biais de la nourriture.

17. Les animaux sont encagés par petits groupes d'individus de même sexe; on peut encager les animaux individuellement si une nécessité scientifique le justifie. Dans le cas d'un encagement en groupe, le nombre d'animaux par cage ne doit pas dépasser cinq. L'accouplement doit avoir lieu dans des cages prévues à cet effet. Les femelles gravides doivent être placées dans des cages individuelles et disposer de matériaux nécessaires à la confection des nids. Les femelles allaitantes doivent être hébergées séparément avec leur portée.

18. La nourriture sera analysée régulièrement à la recherche de contaminants. Un échantillon de nourriture sera prélevé jusqu'à la finalisation du rapport.

Préparation des animaux

19. De jeunes adultes sains sont répartis au hasard entre les groupes de contrôle et de traitement. Les cages sont disposées de façon à minimiser les effets possibles dus à leur agencement. Les animaux sont marqués individuellement à des fins d'identification et maintenus dans leurs cages pendant cinq jours au moins avant le démarrage de l'étude afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire.

Préparation des doses

20. Il est recommandé d'administrer le produit chimique d'essai par voie orale sauf si d'autres voies sont jugées plus indiquées. Lorsque l'administration par voie orale est retenue, le produit chimique d'essai est généralement administré par gavage; toutefois, il peut aussi être administré par le biais des aliments ou de l'eau de boisson.

▼M8

21. Le cas échéant, le produit chimique d'essai est dissout ou mis en suspension dans un véhicule approprié. Il est recommandé, dans la mesure du possible, de recourir en priorité à une solution ou à une suspension aqueuse, en second lieu à une solution dans l'huile (huile de maïs, par exemple), ou à défaut dans d'autres véhicules. Les caractéristiques de toxicité des véhicules, s'ils sont non aqueux, doivent être connues. La stabilité et le caractère homogène du produit chimique d'essai dans le véhicule doivent être déterminés.

MODE OPERATOIRE

Nombre et sexe des animaux

22. Il est recommandé de constituer des groupes d'au moins 10 males et 12-13 femelles. Avant le début de l'exposition, on évaluera les cycles œstraux chez les femelles, et les animaux qui ne présentent pas un cycle classique de 4-5 jours ne seront pas inclus dans l'étude; c'est pourquoi on recommande l'utilisation de femelles supplémentaires, pour parvenir à 10 femelles par groupe. Sauf dans le cas d'effets toxiques marqués, on devrait obtenir au moins 8 femelles gravides par groupe, soit le nombre minimum généralement acceptable. Il s'agit d'aboutir à un nombre suffisant de gestations et à une progéniture suffisamment abondante pour permettre une évaluation fiable de l'action du produit chimique d'essai sur la fertilité, la gravidité, le comportement maternel et l'allaitement, ainsi que sur la croissance et le développement de la descendance F1 à partir de la conception jusqu'au 13ème jour après la parturition.

Détermination des doses

23. En règle générale, on doit disposer d'au moins trois groupes de traitement et d'un groupe témoin. Les niveaux des doses peuvent être déterminés en fonction d'informations tirées d'essais de toxicité aiguë ou de résultats d'études portant sur l'administration de doses répétées. Exception faite de l'administration du produit chimique d'essai, les animaux du groupe témoin doivent être traités de la même manière que ceux des groupes soumis à l'essai. Si un véhicule est utilisé pour administrer le produit chimique d'essai, le groupe témoin doit en recevoir le volume administré le plus élevé.

24. La détermination des niveaux des doses doit prendre en compte toutes les données sur la toxicité et les caractéristiques (toxico-)cinétiques disponibles. Il faut aussi prendre en compte le fait que les femelles gestantes et non-gestantes peuvent présenter des sensibilités différentes. La dose la plus élevée doit être choisie de façon à provoquer des effets toxiques mais sans provoquer la mort ou d'importantes souffrances. Ensuite, il convient de déterminer les doses par ordre décroissant pour mettre en évidence toute relation entre traitement et réponse et, au niveau de la dose la plus faible, l'absence d'effets nocifs observés (CSENO). On considère généralement optimal de définir des intervalles d'un facteur deux à quatre, l'intégration d'un quatrième groupe étant souvent jugé préférable à l'utilisation d'intervalles trop importants (supérieurs à un facteur de 10) entre les niveaux des doses.

25. En cas d'observation d'une toxicité générale (par exemple réduction du poids corporel, effets sur le foie, le cœur, les poumons ou les reins, etc.) ou d'autres modifications susceptibles de ne pas constituer une réponse toxique (par exemple diminution de la prise de nourriture, grossissement du foie), les effets observés sur les paramètres endocriniens devront être interprétés avec précaution.

Épreuve limite

26. Si l'administration orale d'une dose au moins égale à 1 000 mg/kg de poids corporel/jour ou, en cas d'administration par le biais de l'alimentation ou de l'eau, à un pourcentage équivalent dans la nourriture ou dans l'eau (en fonction du poids corporel), selon les modalités précisées pour cette étude, ne provoque aucun effet toxique observable et si aucune toxicité n'est à prévoir compte tenu des données relatives à des substances présentant une structure voisine, on peut juger qu'il n'est pas nécessaire d'entreprendre une étude complète faisant intervenir plusieurs niveaux de doses. Toutefois, l'exposition humaine prévisible peut conduire à retenir un niveau de dose orale plus élevé pour l'essai limite. Pour d'autres types d'administration, tels que l'inhalation et l'absorption par voie cutanée, les propriétés physico-chimiques des produits chimiques d'essai peuvent souvent dicter la concentration maximale qui peut être mise en œuvre.

▼M8

Administration des doses

27. Le produit chimique d'essai est administré aux animaux chaque jour de la semaine. En cas de gavage, les animaux doivent recevoir une dose unique au moyen d'une sonde stomacale ou d'une canule d'intubation adaptée. Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal soumis à l'essai. Il ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf s'il s'agit d'une solution aqueuse pour laquelle le volume peut atteindre 2 ml/100 g de poids corporel. Exception faite de produits chimiques d'essai irritants ou corrosifs qui feront normalement apparaître des effets d'autant plus marqués que les concentrations seront élevées, la variabilité du volume d'essai devrait être réduite au minimum grâce à un ajustement de la concentration de sorte que le volume soit constant quel que soit le niveau de la dose.

28. En cas d'administration par le biais de l'alimentation ou de l'eau, il importe de veiller à ce que les quantités de produit chimique d'essai utilisées ne perturbent pas l'équilibre normal de la nutrition ou de l'hydratation. Lorsque le produit chimique d'essai est administré par la nourriture, on peut retenir soit une concentration constante dans les aliments (ppm), soit un niveau de dose constant par rapport au poids du corps de l'animal; l'option retenue doit être précisée. En cas d'administration par gavage, la dose doit être apportée quotidiennement à heures fixes et ajustée au moins une fois par semaine pour être maintenue à un niveau constant par rapport au poids du corps de l'animal.

Calendrier de l'essai

29. L'administration de la substance aux animaux des deux sexes doit commencer au moins deux semaines avant l'accouplement, après une période d'acclimatation d'au moins cinq jours et après avoir observé que les femelles présentaient un cycle œstral normal (au cours d'une période prétraitement de 2 semaines). L'étude doit être programmée de telle sorte que l'accouplement débute peu après que les animaux ont atteint leur pleine maturité sexuelle. Celle-ci intervient à des âges qui varient légèrement selon les espèces et selon les laboratoires, à savoir 10 semaines pour les rats Sprague Dawley et 12 semaines environ pour les rats Wistar. Les femelles ayant mis bas doivent être sacrifiées le 13ème jour qui suit la parturition ou peu après. Le jour de la naissance (où la parturition est achevée) marque le jour 0 de la période post partum. Les femelles qui ne montrent aucun signe de copulation sont sacrifiées 24 à 26 jours après le dernier jour de la période d'accouplement. L'administration de la substance d'essai aux mâles et aux femelles se poursuit durant la période d'accouplement. Au-delà, elle doit continuer pour les mâles, au moins jusqu'à la fin de la période totale d'administration, soit un minimum de 28 jours. Les mâles sont ensuite sacrifiés ou bien maintenus en vie et continuent alors à recevoir la substance d'essai en vue, le cas échéant, d'un second accouplement.

30. L'administration quotidienne du produit chimique d'essai aux femelles de la génération parentale doit continuer pendant toute la gestation et au moins jusqu'au 3ème jour post partum inclus ou jusqu'au jour précédant le sacrifice. En ce qui concerne les études dans lesquelles le produit chimique d'essai est administré par inhalation ou par voie cutanée, l'administration doit se poursuivre au moins jusqu'au 19ème jour inclus de la gestation, et l'administration doit être initiée à nouveau dès que possible et pas après le 4ème jour suivant la naissance.

31. On trouvera une représentation schématique du calendrier d'essai à l'appendice 2.

Modalités d'accouplement

32. On utilise normalement des couples 1:1 (un mâle pour une femelle). Il peut y avoir exception à cette règle si des mâles viennent à mourir. La femelle doit être placée avec le même mâle jusqu'à ce que la copulation soit avérée ou pendant deux semaines. Chaque matin, il convient d'examiner les femelles pour vérifier la présence de sperme ou d'un bouchon vaginal. Le jour 0 de la gestation est celui où l'accouplement est avéré (présence de sperme ou d'un bouchon vaginal). Lorsque le couple s'avère improductif, on peut envisager de ré-accoupler les femelles avec des mâles éprouvés du même groupe.

▼M8

Taille des portées

33. Au quatrième jour après la naissance, on peut ajuster la taille de chaque portée en éliminant des petits surnuméraires choisis au hasard, afin de s'approcher autant que possible du nombre de quatre ou cinq petits par sexe par portée, en fonction de la taille normale d'une portée dans la souche de rats utilisée. Des échantillons de sang seront prélevés sur deux des animaux surnuméraires, mis en commun, et utilisés pour la détermination des niveaux sériques de T4. Il ne convient pas de procéder à une élimination sélective des petits, par exemple basée sur le poids corporel ou la distance ano-génitale (DAG). Lorsque le nombre de petits mâles et femelles est tel qu'il empêche de disposer de quatre ou cinq animaux de chaque sexe par portée, il est acceptable de procéder à des ajustements partiels (par exemple, six mâles et quatre femelles). Aucun petit ne sera éliminé quand la taille de la portée devient inférieure à la limite d'ajustement de 8 à 10 petits/portée. S'il n'existe qu'un petit surnuméraire au-dessus de la limite d'ajustement, alors ce seul petit surnuméraire sera éliminé et un échantillon de sang prélevé afin de déterminer le niveau sérique de T4.

34. Si la taille des portées n'est pas ajustée, deux petits par portée seront sacrifiés au 4è jour après la naissance et des échantillons de sang seront prélevés pour la mesure des concentrations sériques d'hormones thyroïdiennes. Si possible, les deux petits par portée seront des femelles afin de réserver les males pour l'examen de la persistance du mamelon, exception faite du cas où l'élimination de ces petits ne laisse aucune femelle pour les évaluations terminales. Aucun petit ne sera éliminé quand la taille de la portée devient inférieure à la limite d'ajustement de 8 à 10 petits/portée (en fonction de la taille normale d'une portée chez la souche de rats employée). S'il n'existe qu'un petit surnuméraire au-dessus de la limite d'ajustement, alors ce seul petit surnuméraire sera éliminé et un échantillon de sang prélevé afin de déterminer la concentration sérique de T4.

Observations *In vivo*

Observations cliniques

35. Tout au long de la période d'essai, chaque animal doit être soumis à des observations cliniques au moins une fois par jour, et plus fréquemment lorsque des signes de toxicité sont observés. Il est préférable de faire ces observations au(x) même(s) moment(s) de la journée en tenant compte des périodes culminantes au cours desquelles les effets attendus se manifestent après administration de la substance. Les changements de comportement dignes d'intérêt, ainsi que les signes de parturition difficile ou prolongée, de même que tous les signes de toxicité, mortalité comprise, doivent être consignés. Il convient de préciser le moment de déclenchement, le degré et la durée des signes de toxicité.

Poids corporel et consommation d'aliments et d'eau

36. Les mâles et les femelles doivent être pesés le premier jour d'administration de la substance d'essai, puis au moins une fois par semaine, ainsi que le dernier jour. Au cours de la gestation, les femelles doivent être pesées les jours 0, 7, 14 et 20, et dans les 24 heures qui suivent la parturition (jour 0 ou 1 post partum), ainsi que les 4ème jour et 13ème jour post partum. Ces observations sont à enregistrer de manière individuelle pour chaque animal adulte.

37. Durant les périodes de pré-accouplement, de gestation et de lactation, la consommation alimentaire doit être mesurée au moins une fois par semaine. Cette mesure est facultative pendant la période d'accouplement. La consommation d'eau doit également être mesurée durant les périodes en question lorsque le produit chimique d'essai est administré par l'eau de boisson.

Cycle œstral

38. Les cycles œstraux sont contrôlés avant le début du traitement pour sélectionner pour l'étude des femelles présentant un cycle régulier (voir paragraphe 22). Les frottis vaginaux sont examinés chaque jour depuis le début du traitement jusqu'à la confirmation de l'accouplement. Si l'on suspecte que des effets liés à un stress aigu lors de l'initiation du traitement

▼M8

pourraient perturber le cycle œstral, les laboratoires peuvent exposer les animaux de l'essai pendant deux semaines, puis effectuer des frottis vaginaux chaque jour pour contrôler le cycle œstral pendant un minimum de deux semaines débutant au début de la période de pré-accouplement et se poursuivant durant la période d'accouplement, jusqu'à ce que l'accouplement soit avéré. Pour obtenir des cellules vaginales ou cervicales, on prendra soin d'éviter d'agresser la muqueuse ce qui risquerait d'induire une pseudo-gestation (7) (8).

Caractéristiques de la descendance

39. La durée de la gestation doit être notée et calculée à partir du jour 0. Il importe d'examiner chaque portée dès que possible après la parturition de manière à déterminer le nombre et le sexe des petits, le nombre de morts-nés, de petits vivants et d'avortons (petits de taille sensiblement inférieure à celle des petits témoins), ainsi que les anomalies évidentes.

40. Dans les 24 heures qui suivent la parturition (jours 0 ou 1 post partum) et au moins aux jours 4 et 13 post partum, il faut compter les petits vivants et déterminer leur sexe et également peser les portées. En plus des observations (décrites au paragraphe 35), il faut consigner tout comportement anormal de la descendance.

41. On mesure la DAG de chaque petit au même jour suivant la naissance, entre les JPN 0 et 4. Le poids corporel des petits est relevé le jour de la mesure de la DAG; la DAG est rapportée à une mesure de la taille du petit, de préférence la racine cubique du poids corporel (9). On devra compter le nombre de mamelons/aréoles chez les petits mâles aux JPN 12 ou 13, comme le document d'orientation 151 de l'OCDE le recommande (10).

Biochimie clinique

42. Des échantillons sanguins sont prélevés sur un site défini selon le schéma suivant:

— chez au moins deux petits par portée au jour 4 après la naissance, si le nombre de petits le permet (voir paragraphes 40-41);

— chez toutes les mères et chez au moins deux petits par portée à la fin de l'expérience au jour 13, et

— chez les adultes mâles à la fin de l'expérience.

Tous ces échantillons sont conservés dans des conditions appropriées. Les échantillons de sang des petits à JPN13 et des adultes mâles font l'objet d'un dosage sérique d'hormones thyroïdiennes (T4). D'autres évaluations de T4 dans les échantillons de sang des mères et des petits à JPN 4 peuvent être réalisées, le cas échéant. De manière optionnelle on pourra mesurer d'autres hormones, le cas échéant. Le sang des petits peut être mis en commun par portée pour l'analyse des hormones thyroïdiennes. Les hormones thyroïdiennes (T4 et TSH) seront de préférence mesurées sous forme «totale».

43. Les facteurs suivants peuvent influencer la variabilité et les concentrations absolues des déterminations hormonales:

— le moment du sacrifice, à cause des variations diurnes des concentrations hormonales,

— la méthode de sacrifice, qui devra éviter un stress inutile chez les animaux pouvant affecter les concentrations en hormones thyroïdiennes,

— les kits d'essai pour les déterminations hormonales, dont les courbes standards peuvent différer d'un kit à l'autre.

▼M8

44. Les échantillons de plasma spécifiquement destinés à la détermination des hormones doivent être obtenus à des moments de la journée comparables. Les valeurs numériques obtenues lors de l'analyse des concentrations hormonales diffèrent en fonction du kit commercial utilisé.

Pathologie

Autopsie générale

45. Lors du sacrifice ou en cas de mort survenue au cours de l'étude, les animaux adultes doivent faire l'objet d'un examen macroscopique visant à mettre en évidence d'éventuelles anomalies ou modifications pathologiques. On s'intéressera plus particulièrement aux organes de l'appareil reproducteur. Le nombre de sites d'implantation d'embryons doit être consigné. Les frottis vaginaux sont examinés le matin du jour de la nécropsie pour déterminer quelle est la phase du cycle œstral et permettre une corrélation avec l'histopathologie des ovaires.

46. Les testicules et épididymes de même que la prostate et les vésicules séminales avec les glandes de coagulation entières de tous les animaux mâles adultes devront être débarrassés de tout tissu adhérent si nécessaire, et leur poids mesuré aussitôt après la dissection pour éviter toute déshydratation. En outre, il est possible de relever le poids d'autres organes, tels que le complexe des muscles élévateur de l'anus et bulbo-caverneux, les glandes de Cowper et le gland du pénis chez les mâles, et les ovaires et l'utérus (y compris le col) chez les femelles. Le cas échéant, les mesures doivent être effectuées aussitôt que possible après la dissection

47. Les petits morts ainsi que ceux qui sont sacrifiés au $13^{ème}$ jour post partum, ou peu après, doivent être au moins soumis à un examen externe rigoureux visant à déterminer d'éventuelles anomalies flagrantes. Une attention particulière devra être apportée aux organes génitaux reproducteurs externes, pour lesquels on recherchera des signes de modification de leur développement. Le $13^{ème}$ jour, il faudra conserver la thyroïde d'un petit mâle et d'un petit femelle par portée.

48. Les ovaires, testicules, organes sexuels secondaires (utérus et glaire cervicale, épididymes, prostate, vésicule séminale plus glande coagulantes), thyroïde, ainsi que l'ensemble des organes présentant des lésions macroscopiques de tous les animaux adultes doivent être conservés. La fixation à la formaline n'est pas recommandée pour l'examen de routine des testicules et épididymes. L'emploi du fixateur de Bouin ou du liquide de Davidson modifié est acceptable pour ces tissus (11). La tunique albuginée peut être perforée en douceur et de façon superficielle aux deux pôles de l'organe avec une aiguille permettant une pénétration rapide du liquide de fixation.

Histopathologie

49. Il convient de procéder à un examen histologique précis des ovaires, testicules et épididymes (en accordant une attention particulière aux étapes de la spermatogénèse et à l'histopathologie de la structure des cellules interstitielles des testicules) chez les animaux du groupe ayant reçu les doses les plus élevées et ceux du groupe témoin. Les autres organes conservés, incluant la thyroïde des petits et des animaux adultes, peuvent être examinés s'il y a lieu. Le poids de la thyroïde peut être déterminé après la fixation. L'élimination des tissus adhérents doit également s'opérer avec beaucoup de soin et seulement après la fixation pour éviter d'abîmer les tissus, et par là de compromettre l'analyse d'histopathologie. L'examen doit s'étendre aux animaux des groupes ayant reçu des doses différentes lorsque des modifications sont observées dans le groupe auquel ont été administrées les doses les plus élevées. Le document d'orientation sur l'histopathologie (11) donne plus de détails sur la dissection, la fixation, la section et l'histopathologie des tissues endocriniens.

▼M8

RESULTATS ET RAPPORT

Résultats

50. Des données individuelles sont à fournir pour chaque animal. Elles doivent en outre être présentées sous la forme d'un tableau indiquant pour chaque groupe étudié le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux morts au cours de l'essai ou euthanasiés, ainsi que le moment de la mort ou de l'euthanasie, le nombre d'animaux fertiles, le nombre de femelles gravides, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, une description des signes de toxicité observés, comprenant le moment du déclenchement, la durée et la gravité des effets toxiques éventuels, les types de modifications histopathologiques, ainsi que toutes les informations dignes d'intérêt concernant les portées. On trouvera à l'appendice 3 un modèle de rapport succinct sous forme de tableau qui s'avère très utile pour l'évaluation des effets sur la reproduction et le développement.

51. Compte tenu de la portée restreinte de l'étude, l'analyse statistique visant à vérifier le caractère significatif des résultats n'a qu'une valeur limitée pour de nombreux effets observés, notamment les effets sur la reproduction. Si une analyse statistique est réalisée, la méthode retenue doit convenir à la distribution de la variable examinée et doit être arrêtée préalablement à la mise en route de l'étude. S'il y a lieu, l'unité d'analyse sera la portée. L'analyse statistique de la DAG et de persistance du mamelon doit être basée sur les données individuelles des petits, en prenant en compte les effets sur la portée. L'analyse statistique du poids corporel des petits doit être basée sur les données individuelles des petits, en prenant en compte la taille de la portée. Étant donné la petite taille des groupes, il peut être utile de se référer à d'éventuelles données obtenues dans des études antérieures (taille des portées, par exemple) pour faciliter l'interprétation de l'étude.

Évaluation des résultats

52. Les résultats de cette étude sur la toxicité doivent être évalués en fonction des effets observés, de l'autopsie et des données microscopiques. L'évaluation portera notamment sur le lien entre, d'une part, la dose du produit chimique d'essai et, d'autre part, la présence ou l'absence, l'incidence et la gravité des anomalies, y compris les lésions grossières, les organes cibles désignés, l'infertilité, les anomalies cliniques, l'action sur la reproduction et les portées, les modifications du poids corporel, les effets sur la mortalité et tout autre effet toxique.

53. La période de traitement du mâle étant de courte durée, l'histopathologie des testicules et des épididymes doit aller de pair avec les données sur la fertilité dans le cadre de l'évaluation des effets sur la reproduction chez le mâle. L'utilisation des données des témoins historiques pour la reproduction/développement (par exemple pour la taille des portées, DAG, persistance du mamelon, taux sériques de T4), pourrait, le cas échéant, s'avérer être une aide utile pour l'interprétation des données.

54. Pour le contrôle de la qualité, il est proposé que les données des témoins historiques soient collectées et que les coefficients de variation soient calculés dans le cas de données numériques, tout particulièrement pour les paramètres en lien avec la détection de perturbateurs endocriniens. Ces données peuvent être utilisées à des fins de comparaison quand les études sont évaluées.

Rapport

55. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Produit chimique d'essai:

— source, numéro de lot, date limite d'utilisation si c'est disponible;

— stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue.

▼**M8**

Substance mono-constituant:

— apparence physique, hydro-solubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude;

— identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges:

— caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants.

Véhicule (s'il y a lieu):

— raisons justifiant le choix du véhicule lorsqu'il ne s'agit pas d'eau.

Animaux soumis à l'essai:

— espèce et souche;

— nombre, sexe et âge des animaux;

— origine, conditions d'encagement, type d'alimentation, etc.;

— poids de chaque animal au début de l'essai;

— justification de l'espèce si l'espèce choisie n'est pas le rat.

Conditions de l'essai:

— critères de choix des niveaux de doses;

— précisions concernant la formulation du produit chimique d'essai et de la préparation de l'alimentation, les concentrations obtenues, la stabilité et l'homogénéité de la préparation;

— description détaillée de l'administration du produit chimique d'essai;

— conversion de la concentration du produit chimique d'essai dans la nourriture ou l'eau (ppm) en dose effective (mg/kg de poids corporel/jour), le cas échéant;

— précisions concernant la qualité des aliments et de l'eau;

— description détaillée des protocoles de randomisation utilisés pour sélectionner les petits éliminés de la portée, s'il y a eu élimination.

Results:

— modifications du poids corporel;

— données relatives à la consommation d'aliments et d'eau (si elles sont disponibles);

— données sur les effets toxiques provoqués en fonction du sexe et de la dose, concernant notamment la fertilité, la gestation et tout autre signe de toxicité;

— durée de la gestation;

— effets toxiques ou autres sur la reproduction, la progéniture, la croissance post-natale, etc.;

— nature, gravité et durée des manifestations cliniques observées (réversibles ou non);

— nombre de femelles adultes présentant un cycle œstral normal ou anormal et durée du cycle;

— nombre de petits vivants à la naissance et pertes après implantation;

— données relatives au poids corporel des petits;

— DAG de tous les petits (et poids corporel le jour de la mesure de la DAG);

▼M8

— persistance du mamelon chez les petits mâles;

— taux d'hormones thyroïdiennes chez les petits âgés de 13 jours et les mâles adultes (ainsi que chez les mères et chez les petits âgés de 4 jours si cela a été mesuré);

— nombre de petits présentant des anomalies évidentes, évaluation macroscopique des organes génitaux externes, nombre d'avortons;

— indication du moment de la mort survenue pendant l'étude, ou si l'animal a survécu jusqu'à la fin;

— nombre d'embryons implantés, taille et poids des portées au moment de la consignation de ces données;

— poids corporel lors du sacrifice et poids des organes des animaux de la génération parentale;

— résultats de l'autopsie;

— description détaillée de l'examen histopathologique;

— données sur l'absorption (si elles sont disponibles);

— traitement statistique des résultats, le cas échéant.

Examen des résultats.

Conclusions.

Interprétation des résultats

56. L'étude permettra d'évaluer la toxicité pour la reproduction et le développement liée à l'administration de doses répétées (voir paragraphes 5 et 6). Elle pourrait aider à déterminer s'il y a lieu d'approfondir les recherches et fournir des orientations pour la conception d'études ultérieures. Le document d'orientation n° 43 de l'OCDE devra être consulté pour aider à l'interprétation des résultats liés à la reproduction et au développement (12). Le document d'orientation n° 106 de l'OCDE sur l'évaluation histologique des essais endocriniens et de reproduction chez les rongeurs (11) fournit des informations sur la préparation et l'évaluation des organes (endocriniens) et des frottis vaginaux; ces informations peuvent être utiles dans le cadre de la présente ligne directrice.

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Disponible sur demande auprès de l'Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(2) OCDE (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Disponible sur demande auprès de l'Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(3) OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Disponible sur demande auprès de l'Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(4) OCDE (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 217), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(5) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (N° 19), Organisation de coopération et de développement économiques,.Paris.

▼**M8**

(6) OCDE (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 150), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

(8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L.(1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(10) OCDE (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 151), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(11) OCDE (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 106), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(12) OCDE (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 43), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

▼**M8**

Appendice 1

DÉFINITIONS (VOIR AUSSI LE DOCUMENT D'ORIENTATION N^{O} 150 DE L'OCDE(6))

Androgénicité: capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone androgénique naturelle (par exemple la testostérone) chez un organisme mammifère.

Antiandrogénicité: capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone androgénique naturelle (par exemple la testostérone) chez un organisme mammifère.

Antioestrogenicité: capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone oestrogénique naturelle (par exemple le 17β-oestradiol) chez un organisme mammifère.

Activité antithyroïdienne: capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone thyroïdienne naturelle (par exemple $T_{3)}$ chez un organisme mammifère.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Toxicité pour le développement: prolongement de la toxicité pour la reproduction, qui se traduit pour la progéniture par des perturbations prénatales, périnatales, post-natales, structurelles ou fonctionnelles.

Détermination des doses: notion générale englobant la dose, ainsi que la fréquence et la durée d'administration.

Dose: quantité de produit chimique d'essai administrée, exprimée en poids (g, mg) ou en poids par unité de poids de l'animal soumis à l'essai (mg/kg, par exemple), ou encore en concentration dans l'aliment (ppm).

Toxicité évidente: notion générale qui renvoie aux signes incontestables de toxicité consécutifs à l'administration de la substance d'essai. Ceux-ci doivent être suffisants pour permettre d'évaluer le danger et se manifester de telle manière qu'une augmentation de la dose administrée se traduira selon toute vraisemblance par l'apparition de signes de grave toxicité conduisant probablement à la mort.

Altération de la fertilité: perturbation des fonctions ou de la capacité de reproduction chez le mâle ou chez la femelle..

Toxicité pour la femelle gravide: effets défavorables sur la femelle gravide, spécifiques (effets directs) ou non (effets indirects).

CSENO: concentration sans effet nocif observé. C'est la dose la plus élevée pour laquelle on n'observe aucun effet dommageable lié au traitement.

Oestrogénicité: c'est la capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone naturelle oestrogénique (par exemple le 17β-oestradiol) chez un organisme mammifère.

Toxicité pour la reproduction: effets préjudiciables sur la progéniture ou altération des fonctions ou de la capacité de reproduction chez le mâle et chez la femelle.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

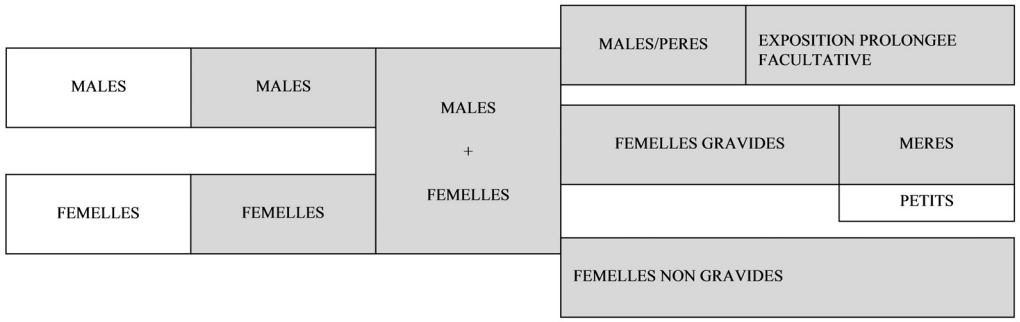
Activité thyroïdienne: c'est la capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone thyroïdienne naturelle (par exemple $T_{3)}$ chez un organisme mammifère.

Validation: processus scientifique visant à caractériser les exigences opératoires et les limites d'une méthode de test et à en démontrer la fiabilité et la pertinence pour un objectif particulier.

▼**M8**

Appendice 2

REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU PROGRAMME D'ESSAI INDIQUANT LA DURÉE MAXIMALE DE L'ÉTUDE, POUR UNE PÉRIODE D'ACCOUPLEMENT COMPLÈTE DE 14 JOURS



Début de l'étude

Évaluation avant exposition du cycle œstral, suivi de l'observation quotidienne des frottis vaginaux du début du traitement jusqu'à ce que l'accouplement soit avéré

Administration du produit chimique d'essai

Pas d'administration du produit chimique d'essai

Autopsie des mâles/pères (après une période d'administration de 4 semaines minimum)

De la parturition (JPN 0) à JPN 4 : DAG chez tous les petits (JPN 0-JPN 4 ; le même jour)
Sacrifice de 2 petits par portée pour évaluation de T4 (JPN 4)

13è jour post-partum
Autopsie des femelles et petits
Persistance du mamelon chez les petits mâles
Autopsie des mâles/pères (facultative)

▼**M8**

Appendice 3

TABLEAU RÉCAPITULATIF DES EFFETS SUR LA REPRODUCTION ET LE DÉVELOPPEMENT

OBSERVATIONS	VALEURS				
Dosage (unités)	0 (témoin)	…	…	…	…
Cycle œstral (au moins durée moyenne et fréquence de cycles irréguliers)					
Femelles présentant signes d'accouplement (N)					
Femelles gravides (N)					
Jours conception 1-5 (N)					
Jours conception 6-… ([1]) (N)					
Gestation ≤ 21 jours (N)					
Gestation = 22 jours (N)					
Gestation ≥ 23 jours (N)					
Mères ayant mis bas petits vivants (N)					
Mères ayant petits vivants au 4ème jour post partum (N)					
Embryons implantés/mère (moyenne)					
Petits vivants/mère à la naissance (moyenne)					
Petits vivants/mère au 4ème jour post partum (moyenne)					
Rapport mâles/femelles à la naissance (moyenne)					
Rapport mâles/femelles au 4ème jour post partum (moyenne)					
Poids des portées à la naissance (moyenne)					
Poids des portées au 4ème jour post partum (moyenne)					
Poids des petits à la naissance (moyenne)					
Poids des petits au moment de la mesure de la DAG (moyenne des mâles, moyenne des femelles)					
DAG des petits mesurée le même jour post natal, entre la naissance et JPN 4 (moyenne des mâles, moyenne des femelles, noter le JPN)					

▼**M8**

OBSERVATIONS	VALEURS				
Dosage (unités)	0 (témoin)	…	…	…	…
Poids des petits au 4ème jour post partum (moyenne)					
Persistance du mamelon chez les petits mâles au jour 13 post partum (moyenne)					
Poids des petits au 13ème jour post partum (moyenne)					
PETITS PRÉSENTANT DES ANOMALIES					
Mères affectées par 0					
Mères affectées par 1					
Mères affectées par ≥ 2					
PERTES DE DESCENDANCE					
Pertes prénatales/après implantation (embryons implantés moins petits vivants à la naissance)					
Femelles affectées par 0					
Femelles affectées par 1					
Femelles affectées par 2					
Femelles affectées par ≥ 3					
Pertes post-natales (Petits vivants à la naissance moins petits vivants au 13ème jour post partum)					
Femelles affectées par 0					
Femelles affectées par 1					
Femelles affectées par 2					
Femelles affectées par ≥ 3					
Cycle œstral (au moins durée moyenne et fréquence de cycles irréguliers)					

([1]) dernier jour de la période d'accouplement

▼M8

B.64. ÉTUDE COMBINÉE DE TOXICITÉ À DOSES RÉPÉTÉES ET DE DÉPISTAGE DE LA TOXICITÉ POUR LA REPRODUCTION ET LE DÉVELOPPEMENT

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 422 de l'OCDE. Les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement mises à jour pour tenir compte des progrès scientifiques. La ligne directrice 422 originale a été adoptée en 1996, sur la base d'un protocole pour une «étude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement», examiné lors de deux réunions d'experts, à Londres en 1990 (1) et à Tokyo en 1992 (2).

2. La présente méthode d'essai comporte une partie relative au dépistage de la toxicité pour la reproduction et/ou le développement fondée sur l'expérience acquise dans les pays Membres par l'application de la méthode initiale à des produits chimiques existants produits en grande quantité et par la réalisation d'essais d'orientation avec des témoins positifs (3) (4). Elle comprend également une partie relative à la toxicité à doses répétées, conforme à la ligne directrice 407 (Étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs, correspondant au chapitre B.7 de la présente annexe).

3. La présente méthode d'essai a été mise à jour en y introduisant des paramètres pertinents pour la détection des perturbateurs endocriniens, suite à une activité prioritaire lancée par l'OCDE en 1998, destinée à réviser les lignes directrices existantes et à en élaborer de nouvelles pour les essais et le dépistage des perturbateurs endocriniens (5). Dans ce contexte, la ligne directrice 407 (Étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs, correspondant au chapitre B.7 de la présente annexe), a été mise à jour en 2008 en y introduisant des paramètres capables de détecter l'activité endocrinienne des produits chimiques d'essai. L'objectif de la mise à jour de la ligne directrice 422 était d'inclure des paramètres pertinents pour l'étude des perturbateurs endocriniens dans des lignes directrices de dépistage au cours desquelles les périodes d'exposition couvrent certaines périodes sensibles du développement (périodes prénatale ou suivant la naissance).

4. Les paramètres pertinents pour la détection des perturbateurs endocriniens qui ont été sélectionnés et ajoutés, font aussi partie de la ligne directrice 443 (Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération, correspondant au chapitre B.56 de la présente annexe); ils ont été introduits dans la ligne directrice 422 sur la base d'une étude de faisabilité étudiant les questions scientifiques et techniques liées à l'inclusion de ces paramètres, ainsi que les ajustements possibles à mettre en œuvre dans la conception de l'essai pour permettre leur inclusion (6).

5. La présente méthode d'essai vise l'obtention d'informations sommaires concernant les effets d'un produit chimique d'essai sur le fonctionnement de la reproduction chez le mâle et la femelle, notamment la fonction gonadique, le comportement lors de l'accouplement, la conception, le développement de l'embryon et la parturition. Elle ne vient pas en remplacement des méthodes d'essai existantes B.31, B.34, B.35 ou B.36.

CONSIDÉRATIONS PRÉLIMINAIRES

6. Lors de l'évaluation et de l'estimation des propriétés toxiques d'un produit chimique d'essai, on peut déterminer la toxicité orale à doses répétées après avoir obtenu une indication sur la toxicité au moyen d'essais de toxicité aiguë. On trouvera dans la présente étude des informations relatives aux dangers possibles pour la santé, découlant d'expositions répétées pendant une période relativement limitée. La méthode comprend l'étude de base de toxicité à doses répétées applicable aux produits chimiques pour lesquels une étude à 90 jours ne se justifie pas (par exemple lorsque le volume de la production ne dépasse pas une certaine limite) ou lorsqu'elle constitue une étude préliminaire à une étude à long terme. Lors de la réalisation de l'étude, il est recommandé de suivre les principes et considérations énoncés dans le document d'orientation n° 19 de l'OCDE sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques en tant qu'effets mesurés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité (7).

▼**M8**

7. L'étude comprend en outre un test de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement et elle peut donc être utilisée pour obtenir des informations initiales sur les effets possibles affectant les capacités reproductrices du mâle et de la femelle telles que la fonction gonadique, le comportement lors de l'accouplement, la conception, le développement de l'embryon et la parturition, soit à un stade précoce de l'évaluation des propriétés toxicologiques des substances chimiques, soit sur des substances chimiques préoccupantes. Cette méthode d'essai ne fournit pas une information exhaustive sur tous les aspects de la reproduction et du développement. En particulier, elle n'offre que des moyens limités pour déceler des manifestations postnatales d'une exposition prénatale ou des effets imputables à une exposition postnatale. En raison (entre autres) du choix des effets observés retenu et de la brièveté de l'étude, cette méthode ne fournit pas toute l'évidence nécessaire à l'étayage d'une conclusion définitive quant à une absence d'effets toxiques pour la reproduction et le développement. De plus, en l'absence de données tirées d'autres essais de toxicité pour la reproduction et le développement, des résultats positifs sont utiles à une évaluation initiale du danger et permettent de juger de la nécessité de procéder à d'autres essais et de définir le calendrier de ceux-ci.

8. Les résultats obtenus concernant les paramètres endocriniens devraient être interprétés à la lumière du «Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des produits chimiques perturbant le système endocrinien» (8). La ligne directrice 422 de l'OCDE mise à jour fait partie du niveau 4 de ce Cadre conceptuel en tant qu'essai *in vivo* apportant des données sur les effets adverses affectant les paramètres endocriniens pertinents. Un signal endocrinien ne sera néanmoins pas toujours considéré comme une preuve suffisante en tant que telle que le produit chimique d'essai est un perturbateur endocrinien.

9. Cette méthode d'essai met également l'accent sur la recherche d'éventuels effets neurologiques et elle insiste sur la nécessité de soumettre les animaux à des observations cliniques minutieuses afin de recueillir le maximum d'observations. La méthode devrait permettre de déceler des produits chimiques présentant des risques de neurotoxicité et pour lesquels des études plus approfondies dans cette voie seraient justifiées. En outre, la méthode peut aussi donner des indications relatives à l'immunotoxicité.

10. En l'absence de données résultant d'autres études de toxicité systémique, de toxicité pour la reproduction et le développement, de neurotoxicité et/ou d'immunotoxicité, des résultats positifs permettent de faire une évaluation préliminaire des dangers et d'orienter les décisions quant à la nécessité d'effectuer et de programmer des essais supplémentaires. Ce test peut être particulièrement utile dans le dossier OCDE d'Examen détaillé des données (EDD) des substances existantes, celles pour lesquelles on dispose de peu ou pas de données toxicologiques, où il peut être utilisé comme une alternative à la conduite de deux tests séparés, respectivement pour la toxicité à dose répétée (ligne directrice 407 de l'OCDE, correspondant au chapitre B.7 de la présente annexe) et pour la toxicité pour la reproduction et le développement (ligne directrice 421 de l'OCDE, correspondant au chapitre B.63 de la présente annexe). Il peut être aussi utilisé pour sélectionner la gamme des doses en vue d'études sur la reproduction et le développement plus extensives, ou dans les cas où cela est jugé pertinent.

11. Il est généralement admis qu'il existe des différences de sensibilité entre les femelles gravides et celles qui ne le sont pas. En conséquence, il peut s'avérer plus difficile de déterminer les niveaux de dose appropriés qui permettent l'évaluation de la toxicité systémique générale et de la toxicité particulière pour la reproduction et le développement dans cet essai combiné que lorsque des essais distincts sont menés séparément. De plus, du fait de la complexité technique de l'essai, la réalisation de cet essai de dépistage

▼M8

combiné peut dépasser les compétences de laboratoires inexpérimentés. Cependant, outre le plus petit nombre d'animaux implique l'essai combiné peut être un meilleur moyen de distinguer les effets directs sur la reproduction et le développement de ceux, secondaires à d'autres effets (systémiques).

12. Dans le présent essai, la période d'administration des doses est plus longue que dans l'étude classique de toxicité à doses répétées sur 28 jours. En revanche, elle utilise moins d'animaux de chaque sexe par groupe par rapport au nombre d'animaux utilisés dans l'exécution d'une étude classique à doses répétées sur 28 jours qui serait faite à la suite d'un essai de dépistage de toxicité pour la reproduction et le développement.

13. La présente méthode d'essai postule que le produit chimique d'essai est administré par voie orale. Des modifications peuvent être nécessaires si d'autres voies d'exposition sont utilisées.

14. Avant d'utiliser la méthode d'essai sur un mélange pour générer des données avec pour objectif recherché l'application réglementaire, on considérera si, et si oui pourquoi, elle peut fournir des résultats adéquats dans cet objectif. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé.

15. On trouvera à l'appendice 1 les définitions des termes utilisés.

PRINCIPE DE L'ESSAI

16. Le produit chimique d'essai est administré en doses successives à plusieurs groupes de mâles et de femelles. L'administration aux mâles devrait s'étendre sur une période d'au moins quatre semaines jusque, et y compris, le jour précédant le sacrifice programmé de l'animal (cette période de quatre semaines couvre une période minimale de deux semaines avant et au cours de la période d'accouplement et une période approximative de deux semaines après l'accouplement). En ce qui concerne les mâles, étant donné la brièveté de l'administration avant l'accouplement, la fécondité pourrait ne pas être un indicateur particulièrement sensible de la toxicité testiculaire. En conséquence, il est indispensable de procéder à un examen histologique détaillé des testicules. On considère que la combinaisonde l'administration des doses pendant deux semaines avant l'accouplement et des observations subséquentes sur l'accouplement et la fécondité (portant à quatre semaines minimum la période totale d'administration des doses), complétée par l'analyse histopathologique approfondie des gonades mâles, permet la détection de la plupart des effets sur la fécondité masculine et sur la spermatogenèse.

17. Les doses doivent être administrées aux femelles pendant toute la durée de l'étude, c'est-à-dire deux semaines avant l'accouplement (visant à couvrir au moins deux cycles menstruels complets), plus le temps variable qui peut s'écouler jusqu'à la conception, la durée de la gestation et au moins treize jours après la parturition, jusque et y compris le jour précédant le sacrifice de l'animal.

18. La durée de l'étude, après l'acclimatation des animaux et évaluation du cycle œstral préalable au traitement, dépend du comportement des femelles mais couvre environ 63 jours, [14 jours avant l'accouplement, la période d'accouplement (qui peut atteindre 14 jours), 22 jours de gestation et 13 jours de lactation].

19. Au cours de la période d'administration des doses, les animaux sont soigneusement observés à un rythme quotidien pour déceler tout signe de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont sacrifiés au cours de l'essai sont autopsiés, et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont sacrifiés et autopsiés.

▼M8

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Choix des espèces

20. La présente méthode d'essai est conçue pour être appliquée au rat. Si les paramètres spécifiés dans la présente ligne directrice 422 sont examinés chez une autre espèce de rongeur, une justification détaillée sera donnée. Dans le programme international de validation pour la détection des perturbateurs endocriniens pour la ligne directrice 407, le rat était la seule espèce utilisée. Il convient d'éviter l'utilisation de souches de faible fécondité ou dont on sait qu'elles sont souvent affectées de défauts de développement. Il faut utiliser des animaux sains et vierges, qui n'ont jamais fait l'objet d'essais antérieurs. Les animaux d'essai doivent être caractérisés par leur espèce, leur souche, leur sexe, leur poids et leur âge. Au début de l'étude, la variation de poids des animaux utilisés devrait être minimale et ne pas dépasser ± 20 % du poids moyen pour chaque sexe. Lorsque l'essai est conduit à titre d'étude préliminaire à une étude de toxicité à long terme ou une étude portant sur une génération complète, il est préférable d'utiliser des animaux issus de la même souche et de la même source dans les deux études.

Conditions d'encagement et d'alimentation

21. Toutes les procédures se conformeront aux normes locales en vigueur en matière de protection des animaux de laboratoire. La température dans la salle des animaux doit être maintenue à 22 °C (± 3 °). L'humidité relative doit être maintenue à 30 pour cent au moins et ne doit pas dépasser 70 pour cent, sauf durant le nettoyage de la salle. Un éclairage artificiel doit être dispensé pour obtenir une photopériode de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. L'alimentation pourra comporter une nourriture classique de laboratoire et de l'eau à satiété. Le choix du régime alimentaire peut être dicté par la nécessité d'assurer un mélange satisfaisant du produit chimique d'essai lorsque celui-ci est administré par le biais de la nourriture.

22. Les animaux sont encagés par petits groupes d'individus de même sexe; on peut encager les animaux individuellement si une nécessité scientifique le justifie. Dans le cas d'un encagement en groupe, le nombre d'animaux par cage ne doit pas dépasser cinq. L'accouplement doit avoir lieu dans des cages prévues à cet effet. Les femelles gravides doivent être placées dans des cages individuelles et disposer de matériaux nécessaires à la confection des nids. Les femelles allaitantes doivent être hébergées séparément avec leur portée.

23. La nourriture sera analysée régulièrement à la recherche de contaminants. Un échantillon de nourriture sera prélevé jusqu'à la finalisation du rapport.

Préparation des animaux

24. De jeunes adultes sains doivent être choisis au hasard pour être affectés aux groupes traités et aux cages. Les animaux sont marqués afin de permettre leur identification et sont placés dans leur cage pendant au moins cinq jours avant le début de l'étude afin de les acclimater aux conditions du laboratoire.

Préparation des doses

25. Il est recommandé d'administrer le produit chimique d'essai par voie orale, à moins que d'autres voies soient considérées comme plus appropriées. Lorsque la voie orale est choisie, le produit chimique d'essai est généralement administré par gavage; toutefois, dans certains cas, les produits chimiques d'essai peuvent aussi être administrés dans l'alimentation ou dans l'eau de boisson.

26. Le cas échéant, le produit chimique d'essai est dissout ou mis en suspension dans un véhicule approprié. Il est recommandé, dans la mesure du possible, de recourir en priorité à une solution ou à une suspension aqueuse, en second lieu à une solution dans l'huile (huile de maïs, par exemple), ou à défaut dans d'autres véhicules. Les caractéristiques de toxicité des véhicules, s'ils sont non aqueux, doivent être connues. La stabilité et le caractère homogène du produit chimique d'essai dans le véhicule doivent être déterminés.

▼M8

MODE OPÉRATOIRE

Nombre et sexe des animaux

27. Il est recommandé de constituer des groupes d'au moins 10 males et 12-13 femelles. Avant le début de l'exposition, on évaluera les cycles œstraux chez les femelles, et les animaux qui ne présentent pas un cycle classique de 4-5 jours ne seront pas inclus dans l'étude; c'est pourquoi on recommande l'utilisation de femelles supplémentaires, pour parvenir à 10 femelles par groupe. Sauf dans le cas d'effets toxiques marqués, on devrait obtenir au moins 8 femelles gravides par groupe, soit le nombre minimum généralement acceptable. Il s'agit d'aboutir à un nombre suffisant de gestations et à une progéniture suffisamment abondante pour permettre une évaluation fiable de l'action du produit chimique d'essai sur la fertilité, la gravidité, le comportement maternel et l'allaitement, ainsi que sur la croissance et le développement de la descendance F1 à partir de la conception jusqu'au 13ème jour après la parturition. S'il est prévu de sacrifier des animaux au cours de cette période, le nombre d'animaux d'essai doit être augmenté du nombre d'animaux qu'il est prévu de sacrifier avant le terme de l'étude. Il convient d'envisager l'adjonction d'un groupe satellite supplémentaire de cinq animaux par sexe dans le groupe témoin et dans le groupe soumis à la dose maximale afin d'observer la réversibilité, la persistance ou l'apparition d'effets toxiques systémiques différés, pendant au moins 14 jours après la fin du traitement. Les animaux du groupe satellite ne seront pas accouplés et ne pourront donc pas être utilisés pour évaluer la toxicité pour la reproduction et le développement.

Détermination des doses

28. En général, il faudra utiliser au moins trois groupes d'essai et un groupe témoin. Si on ne dispose pas de données appropriées relatives à la toxicité générale, il y aura lieu d'effectuer une étude d'orientation (avec des animaux de même souche et même source) afin de déterminer les doses à utiliser. Exception faite de l'administration du produit chimique d'essai, les animaux du groupe témoin doivent être traités de la même manière que ceux des groupes soumis à l'essai. Si un véhicule est utilisé pour administrer le produit chimique d'essai, le groupe témoin doit en recevoir le volume administré le plus élevé.

29. La détermination des niveaux des doses doit prendre en compte toutes les données sur la toxicité et les caractéristiques (toxico-)cinétiques disponibles. Il faut aussi prendre en compte le fait que les femelles gestantes et non-gestantes peuvent présenter des sensibilités différentes. La dose la plus élevée doit être choisie de façon à provoquer des effets toxiques mais sans provoquer la mort ou des souffrances manifestes. Ensuite, il convient de déterminer les doses par ordre décroissant pour mettre en évidence toute relation entre traitement et réponse et, au niveau de la dose la plus faible, l'absence d'effets nocifs. On considère généralement optimal de définir des intervalles d'un facteur deux à quatre, l'intégration d'un quatrième groupe étant souvent jugé préférable à l'utilisation d'intervalles trop importants (supérieurs à un facteur de 10) entre les niveaux des doses.

30. En cas d'observation d'une toxicité générale (par exemple réduction du poids corporel, effets sur le foie, le cœur, les poumons ou les reins, etc.) ou d'autres modifications susceptibles de ne pas constituer une réponse toxique (par exemple diminution de la prise de nourriture, grossissement du foie), les effets observés sur les paramètres endocriniens devront être interprétés avec précaution.

Épreuve limite

31. Si l'administration orale d'une dose au moins égale à 1 000 mg/kg de poids corporel/jour ou, en cas d'administration par le biais de l'alimentation, à un pourcentage équivalent dans la nourriture ou dans l'eau (en fonction du poids corporel), selon les modalités précisées pour cette étude, ne provoque aucun effet toxique observable et si aucune toxicité n'est à prévoir compte tenu des données relatives à des substances présentant une structure voisine, on peut juger qu'il n'est pas nécessaire d'entreprendre une étude complète faisant

▼M8

intervenir plusieurs niveaux de doses. Toutefois, l'exposition humaine prévisible peut conduire à retenir un niveau de dose plus élevé pour l'essai limite. Pour d'autres types d'administration, tels que l'inhalation et l'absorption par voie cutanée, les propriétés physico-chimiques des substances d'essai peuvent souvent dicter l'exposition maximale qui peut être mise en œuvre.

Administration des doses

32. Le produit chimique d'essai est administré aux animaux chaque jour de la semaine. En cas de gavage, les animaux doivent recevoir une dose unique au moyen d'une sonde stomacale ou d'une canule d'intubation adaptée. Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal soumis à l'essai. Il ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf s'il s'agit d'une solution aqueuse pour laquelle le volume peutatteindre 2 ml/100 g de poids corporel. Exception faite de produits chimiques d'essai irritants ou corrosifs qui feront normalement apparaître des effets d'autant plus marqués que les concentrations seront élevées, la variabilité du volume d'essai devrait être réduite au minimum grâce à un ajustement de la concentration de sorte que le volume soit constant quel que soit le niveau de la dose.

33. En cas d'administration par le biais de l'alimentation ou de l'eau, il importe de veiller à ce que les quantités de produit chimique d'essai utilisées ne perturbent pas l'équilibre normal de la nutrition ou de l'hydratation. Lorsque le produit chimique d'essai est administré par la nourriture, on peut retenir soit une concentration constante dans les aliments (ppm), soit un niveau de dose constant par rapport au poids du corps de l'animal; l'option retenue doit être précisée. En cas d'administration par gavage, la dose doit être apportée quotidiennement à heures fixes et ajustée au moins une fois par semaine pour être maintenue à un niveau constant par rapport au poids du corps de l'animal. Lorsque l'étude combinée est une étude préliminaire à une étude de toxicité à long terme ou à une étude approfondie de la toxicité pour la reproduction, il faut prendre soin d'assurer une alimentation identique dans les deux études.

Calendrier de l'étude

34. L'administration de la substance aux animaux des deux sexes doit commencer deux semaines avant l'accouplement, après une période d'acclimatation d'au moins cinq jours et après avoir observé que les femelles présentaient un cycle œstral normal (au cours d'une période prétraitement de 2 semaines). L'étude doit être programmée de telle sorte que l'accouplement débute peu après que les animaux ont atteint leur pleine maturité sexuelle. Celle-ci intervient à des âges qui varient légèrement selon les espèces et selon les laboratoires, à savoir 10 semaines pour les rats Sprague Dawley et 12 semaines environ pour les rats Wistar. Les femelles ayant mis bas doivent être sacrifiées le 13ème jour qui suit la parturition ou peu après. Afin d'astreindre les femelles à un jeûne de douze heures avant le prélèvement de sang (si telle est l'option choisie), il n'est pas nécessaire de sacrifier les femelles et leur progéniture le même jour. Le jour de la naissance (où la parturition est achevée) marque le jour 0 de la période post partum. Les femelles qui ne montrent aucun signe de copulation sont sacrifiées 24 à 26 jours après le dernier jour de la période d'accouplement. L'administration de la substance d'essai aux mâles et aux femelles se poursuit durant la période d'accouplement. Au-delà, elle doit continuer pour les mâles, au moins jusqu'à la fin de la période totale d'administration, soit un minimum de 28 jours. Les mâles sont ensuite sacrifiés ou bien maintenus en vie et continuent alors à recevoir la substance d'essai en vue, le cas échéant, d'un second accouplement.

35. L'administration quotidienne du produit chimique d'essai aux femelles de la génération parentale doit continuer pendant toute la gestation et au moins jusqu'au 3ème jour post partum inclus ou jusqu'au jour précédant le sacrifice. En ce qui concerne les études dans lesquelles le produit chimique d'essai est administré par inhalation ou par voie cutanée, l'administration doit se poursuivre au moins jusqu'au 19ème jour inclus de la gestation, et l'administration doit être initiée à nouveau dès que possible et pas après le 4ème jour suivant la naissance (jour post-naissance - JPN).

▼M8

36. Les animaux appartenant au groupe satellite, réservés aux observations de suivi, si elles sont prévues, ne sont pas soumis à l'accouplement. Ils devraient être maintenus en vie sans être traités pendant 14 jours au moins après le premier sacrifice de femelles prévu, afin de déceler l'apparition différée, la persistance ou la disparition complète des effets toxiques.

37. On trouvera une représentation schématique du calendrier d'essai à l'appendice 2.

Cycle œstral

38. Les cycles œstraux sont contrôlés avant le début du traitement pour sélectionner pour l'étude des femelles présentant un cycle régulier (voir paragraphe 27). Les frottis vaginaux sont examinés chaque jour depuis le début du traitement jusqu'à la confirmation de l'accouplement. Si l'on suspecte que des effets liés à un stress aigu lors de l'initiation du traitement pourraient perturber le cycle œstral, les laboratoires peuvent exposer les animaux de l'essai pendant deux semaines, puis effectuer des frottis vaginaux chaque jour pour contrôler le cycle œstral pendant un minimum de deux semaines débutant au début de la période de pré-accouplement et se poursuivant durant la période d'accouplement, jusqu'à ce que l'accouplement soit avéré. Pour obtenir des cellules vaginales ou cervicales, on prendra soin d'éviter d'agresser la muqueuse ce qui risquerait d'induire une pseudo-gestation (8) (9).

Modalités d'accouplement

39. On utilise normalement des couples 1:1 (un mâle pour une femelle). Il peut y avoir exception à cette règle si des mâles viennent à mourir. La femelle doit être placée avec le même mâle jusqu'à ce que la copulation soit avérée ou pendant deux semaines. Chaque matin, il convient d'examiner les femelles pour vérifier la présence de sperme ou d'un bouchon vaginal. Le jour 0 de la gestation est celui où l'accouplement est avéré (présence de sperme ou d'un bouchon vaginal). Lorsque le couple s'avère improductif, on peut envisager de ré-accoupler les femelles avec des mâles éprouvés du même groupe.

Taille des portées

40. Au quatrième jour après la naissance, on peut ajuster la taille de chaque portée en éliminant des petits surnuméraires choisis au hasard, afin de s'approcher autant que possible du nombre de quatre ou cinq petits par sexe par portée, en fonction de la taille normale d'une portée dans la souche de rats utilisée. Des échantillons de sang seront prélevés sur deux des animaux surnuméraires, mis en commun, et utilisés pour la détermination des niveaux sériques de T4. Il ne convient pas de procéder à une élimination sélective des petits, par exemple basée sur le poids corporel ou la distance ano-génitale (DAG). Lorsque le nombre de petits mâles et femelles est tel qu'il empêche de disposer de quatre ou cinq animaux de chaque sexe par portée, il est acceptable de procéder à des ajustements partiels (par exemple, six mâles et quatre femelles). Aucun petit ne sera éliminé quand la taille de la portée devient inférieure à la limite d'ajustement de 8 à 10 petits/portée. S'il n'existe qu'un petit surnuméraire au-dessus de la limite d'ajustement, alors ce seul petit surnuméraire sera éliminé et un échantillon de sang prélevé afin de déterminer la concentration sérique de T4.

41. Si la taille des portées n'est pas ajustée, deux petits par portée seront sacrifiés au 4è jour après la naissance et des échantillons de sang seront prélevés pour la mesure des concentrations sériques d'hormones thyroïdiennes. Si possible, les deux petits par portée seront des femelles afin de réserver les males pour l'examen de la persistance du mamelon, exception faite du cas où l'élimination de ces petits ne laisse aucune femelle pour les évaluations terminales. Aucun petit ne sera éliminé quand la taille de la portée devient inférieure à la limite d'ajustement de 8 à 10 petits/portée (en fonction de la taille normale d'une portée chez la souche de rats employée). S'il n'existe qu'un petit surnuméraire au-dessus de la limite d'ajustement, alors ce seul petit surnuméraire sera éliminé et un échantillon de sang prélevé afin de déterminer la concentration sérique de T4.

▼M8

Observations

42. Tous les jours, les animaux doivent faire l'objet d'un examen clinique général, de préférence aux même(s) moments de la journée et en considérant la période du pic des effets attendus après administration des doses. L'état de santé des animaux doit être noté. Des observations de morbidité et de mortalité sont effectuées sur tous les animaux au moins deux fois par jour.

43. Chaque animal de la génération parentale doit faire l'objet d'un examen clinique détaillé avant la première exposition (pour permettre des comparaisons sur le même sujet) et au moins une semaine après. Ces examens doivent être effectués hors de la cage d'hébergement sur une aire standard. Ces observations doivent être soigneusement notées, de préférence au moyen de systèmes de notations explicitement définis par le laboratoire. Il faut s'efforcer de minimaliser les variations des conditions de l'essai et les examens doivent être conduits de préférence par des observateurs tenus dans l'ignorance du traitement. Les observations notées devraient porter, sans que cette liste soit exhaustive, sur les modifications de la peau, de la fourrure, des yeux, des membranes muqueuses, sur l'apparition de sécrétions et d'excrétions et sur les activités réflexes (par exemple larmes, érection des poils, diamètre de la pupille, rythme respiratoire inhabituel). Il convient également de noter tout changement de la démarche, de la posture, de la réaction à la manipulation ainsi que l'apparition de mouvements spasmodiques ou de contractures, de stéréotypes (par exemple toilettage excessif, circuits répétitifs), parturition difficile ou prolongée ou comportements bizarres (par exemple automutilation, marche à reculons) (11).

44. A un certain moment au cours de l'étude, il convient également d'étudier la réactivité sensorielle à des stimuli de divers types (par exemple stimuli auditif, visuel et proprioceptif) (8) (9) (11), la force de préemption (12) et l'activité motrice (13). Ces études doivent être menées sur cinq mâles et cinq femelles choisis au hasard dans chaque groupe. On trouvera dans les références bibliographiques susmentionnées plus de détails sur les modes opératoires. Toutefois, il est possible de recourir à d'autres modes opératoires. Chez les mâles, ces observations fonctionnelles devraient être effectuées vers la fin de la période d'administration de la substance d'essai, peu de temps avant la date prévue pour leur sacrifice mais avant l'échantillonnage du sang pour les analyses hématologiques ou de chimie clinique (voir paragraphes 53-56 ainsi que la note de bas de page relative à ces paragraphes). Les femelles devraient se trouver dans le même état physiologique au cours de ces tests fonctionnels qui devraient être menés, de préférence une fois au cours de la dernière semaine de lactation (par exemple, 6è-13è jour de lactation), peu de de temps avant la date fixée pour leur sacrifice. Dans la mesure du possible, il faudra limiter le plus possible la durée des périodes de séparation des mères et des petits.

45. On peut omettre ces observations fonctionnelles à effectuer une fois vers la fin de l'étude lorsque cette dernière est une étude d'orientation préliminaire à une étude ultérieure subchronique (90 jours) ou à long terme. Dans ce cas, les observations fonctionnelles devraient être effectuées au cours de l'étude à plus long terme. Dans d'autres cas, les données disponibles sur les observations fonctionnelles dans cette étude à dose répétée peuvent augmenter la capacité de choisir les doses pour une étude consécutive subchronique ou à long terme.

46. À titre exceptionnel, on peut également omettre les observations fonctionnelles pour des groupes qui manifestent des effets toxiques à un niveau qui risquerait d'interférer significativement avec les résultats des essais fonctionnels.

47. Il convient de noter la durée de la gestation, calculée à partir du jour 0 défini ci-dessus. Chaque portée devrait être examinée aussitôt que possible après sa mise-bas afin de déterminer le nombre et le sexe des petits, des mort-nés, des vivants, des avortons (petits d'une taille nettement inférieure à celle des individus témoins) ainsi que la présence de grosses anomalies.

▼M8

48. Il convient de dénombrer et de déterminer le sexe des petits vivants et de peser les portées dans les 24 heures suivant la parturition (jour 0 ou 1 post partum), et au moins les 4ème et 13ème jours post partum. Outre les observations portant sur les animaux parents (voir paragraphes 43 et 44) il faut noter tout comportement anormal des rejetons.

49. On mesure la DAG de chaque petit au même jour suivant la naissance, entre les JPN 0 et 4. Le poids corporel des petits est relevé le jour de la mesure de la DAG; la DAG est rapportée à une mesure de la taille du petit, de préférence la racine cubique du poids corporel (14). On devra compter le nombre de mamelons/aréoles chez les petits mâles aux JPN 12 ou 13, comme le document d'orientation 151 de l'OCDE le recommande (15).

Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau

50. Les mâles et les femelles doivent être pesés le premier jour d'administration de la substance d'essai, puis au moins une fois par semaine, ainsi que le dernier jour. Au cours de la gestation, les femelles doivent être pesées les jours 0, 7, 14 et 20, et dans les 24 heures qui suivent la parturition (jour 0 ou 1 post partum), ainsi que les 4ème et 13ème jours post partum. Ces observations sont à enregistrer de manière individuelle pour chaque animal adulte.

51. Durant les périodes de pré-accouplement, de gestation et de lactation, la consommation alimentaire doit être mesurée au moins une fois par semaine. Cette mesure est facultative pendant la période d'accouplement. La consommation d'eau doit également être mesurée durant les périodes en question lorsque le produit chimique d'essai est administré par ce moyen.

Hématologie

52. Une fois au cours de l'étude, il convient d'effectuer sur cinq mâles et cinq femelles choisis au hasard dans chaque groupe les examens hématologiques suivants: hématocrite, concentrations d'hémoglobine, comptage des érythrocytes, réticulocytes, comptage total et différentiel des leucocytes, comptage des plaquettes et mesure du temps et du potentiel de coagulation du sang. D'autres analyses telles que la concentration en méthémoglobine et les corps de Heinz seront réalisées si le produit chimique d'essai ou ses métabolites supposés ont ou sont suspectés d'avoir des propriétés oxydantes.

53. Les échantillons de sang doivent être prélevés sur un site bien déterminé. Les femelles doivent se trouver dans le même état physiologique au cours de l'échantillonnage. Afin d'éviter des difficultés pratiques liées à la variabilité du début de la gestation, les prélèvements de sang chez les femelles doivent être effectués à la fin de la période de pré-accouplement au lieu d'être prélevé juste avant ou au cours du sacrifice des animaux. Les échantillons de sang des mâles devraient de préférence être prélevés juste avant, ou pendant le sacrifice des animaux. On peut aussi prélever le sang des mâles à la fin de la période de pré-accouplement au cas où cette option aurait été choisie pour les femelles.

54. Les échantillons de sang doivent être conservés dans des conditions adéquates.

Biochimie clinique

55. Les études de biochimie clinique ont pour objet d'étudier les principaux effets toxiques sur les tissus et, plus précisément, sur le rein et le foie. Elles doivent être exécutées sur des échantillons de sang prélevés sur les

▼M8

cinq mâles et les cinq femelles choisis dans chaque groupe. Il est recommandé d'effectuer les prélèvements de sang sur des animaux à jeun depuis la veille au soir ([1]) L'étude du plasma ou du sérum comporte la détermination des substances ci-après: sodium, potassium, glucose, cholestérol total, urée, créatinine, protéines totales et albumine, au moins deux enzymes indicatrices d'effets sur les cellules hépatiques (telles que l'alanine-aminotransférase, l'aspartate-aminotransférase et la sorbitol-déshydrogénase) ainsi que les acides biliaires. Dans certaines circonstances, la mesure d'autres enzymes (hépatiques ou autres) et de la bilirubine peut fournir des informations utiles.

56. Des échantillons sanguins sont prélevés sur un site défini selon le schéma suivant:

— chez au moins deux petits par portée au jour 4 après la naissance, si le nombre de petits le permet (voir paragraphes 40-41);

— chez toutes les mères et chez au moins deux petits par portée à la fin de l'expérience au jour 13, et

— chez les adultes mâles à la fin de l'expérience.

Tous ces échantillons sont conservés dans des conditions appropriées. Les échantillons de sang des petits à JPN13 et des adultes mâles font l'objet d'un dosage sérique d'hormones thyroïdiennes (T4). D'autres évaluations de T4 dans les échantillons de sang des mères et des petits à JPN 4 peuvent être réalisées, le cas échéant. De manière optionnelle on pourra mesurer d'autres hormones, le cas échéant. Le sang des petits peut être mis en commun par portée pour l'analyse des hormones thyroïdiennes. Les hormones thyroïdiennes (T4 et TSH) seront de préférence mesurées sous forme «totale».

57. À titre facultatif, on peut effectuer les observations ci-après sur les urines de cinq mâles choisis au hasard dans chaque groupe, recueillies pendant un intervalle de temps déterminé au cours de la dernière semaine de l'étude: apparence, volume, osmolalité ou masse volumique, pH, protéines, glucose, sang/cellules sanguines.

58. En outre, on peut envisager de rechercher dans le sérum des indicateurs de dommages aux tissus. D'autres analyses pourraient être effectuées si les propriétés connues du produit chimique d'essai sont susceptibles, ou peuvent être soupçonnées, de perturber des activités métaboliques et leurs indicateurs tels que le calcium, les phosphates, les triglycérides à jeun, le glucose à jeun, certaines hormones, la méthémoglobine et la cholinestérase. Le dosage de ces substances se fera au cas par cas.

59. Les facteurs suivants peuvent influencer la variabilité et les concentrations absolues des déterminations hormonales:

— le moment du sacrifice, à cause des variations diurnes des concentrations hormonales,

([1]) Pour un certain nombre de mesures sur le sérum ou le plasma, notamment pour la mesure du glucose, il est préférable de prélever le sang sur l'animal à jeun depuis la veille. La principale raison de cette préférence tient au fait que si l'animal n'est pas à jeun les résultats seront inévitablement plus variables, ce qui tendra à masquer les effets les moins évidents et rendra l'interprétation des résultats plus difficile. D'autre part, le maintien à jeun de l'animal peut interférer avec le métabolisme général des animaux (gravides), perturber les comportements de lactation et d'allaitement et pourrait perturber, surtout dans les études de nutrition, l'exposition quotidienne à la substance d'essai. Si on adopte la pratique du prélèvement à jeun depuis la veille au soir, les analyses de biochimie clinique devraient être exécutées après les observations fonctionnelles à effectuer pendant la 4ème semaine de l'étude.

▼M8

— la méthode de sacrifice, qui devra éviter un stress inutile chez les animaux pouvant affecter les concentrations en hormones thyroïdiennes

— les kits d'essai pour les déterminations hormonales, dont les courbes standards peuvent différer d'un kit à l'autre.

60. Les échantillons de plasma spécifiquement destinés à la détermination des hormones doivent être obtenus à des moments de la journée comparables. Les valeurs numériques obtenues lors de l'analyse des concentrations hormonales diffèrent en fonction du kit commercial utilisé.

61. Si l'on ne dispose pas d'une base de données historiques adéquate, il faut envisager de déterminer les paramètres hématologiques et biochimiques avant d'administrer la substance d'essai, ou de façon préférable, réaliser ces déterminations dans un groupe d'animaux qui ne soit pas inclus dans le groupe d'animaux de l'expérience. Pour les femelles, les données doivent provenir des femelles allaitantes.

PATHOLOGIE

Autopsie générale

62. Tous les animaux adultes étudiés doivent faire l'objet d'une autopsie générale complète et détaillée qui comporte un examen minutieux de la surface externe du corps, de tous les orifices et des cavités crânienne, thoracique et abdominale ainsi que du contenu de ces cavités. On s'intéressera plus particulièrement aux organes de l'appareil reproducteur. Le nombre de sites d'implantation d'embryons doit être consigné. Les frottis vaginaux sont examinés le matin du jour de la nécropsie pour déterminer quelle est la phase du cycle œstral et permettre une corrélation avec l'histopathologie des organes reproducteurs femelles.

63. Les testicules et épididymes de même que la prostate et les vésicules séminales avec les glandes de coagulation entières de tous les animaux mâles adultes devront être débarrassés de tout tissu adhérent si nécessaire, et leur poids mesuré aussitôt après la dissection pour éviter toute déshydratation. En outre, il est possible de relever le poids d'autres organes, tels que le complexe des muscles élévateur de l'anus et bulbo-caverneux, les glandes de Cowper et le gland du pénis chez les mâles, et les ovaires et l'utérus (y compris le col) chez les femelles. Le cas échéant, ces mesures doivent être effectuées aussitôt que possible après la dissection. Les ovaires, les testicules, les épididymes, les organes sexuels accessoires, et tous les organes des animaux adultes présentant des lésions macroscopiques seront conservés.

64. La glande thyroïde de tous les adultes mâles et femelles ainsi que d'un male et d'une femelle de 13 jours de chaque portée doit être préservée dans le milieu de fixation le plus approprié en vue des examens histopathologiques prévus ultérieurement. Le poids de la thyroïde peut être déterminé après la fixation. L'élimination des tissus adhérents doit également s'opérer avec beaucoup de soin et seulement après la fixation pour éviter d'abîmer les tissus, et par là de compromettre l'analyse d'histopathologie. Des échantillons de sang doivent être prélevés à un endroit spécifié juste avant ou pendant la procédure d'euthanasie des animaux, et stockés dans des conditions appropriées (voir paragraphe 56).

▼M8

65. En outre, on choisira au hasard au moins cinq mâles et cinq femelles adultes dans chaque groupe (à l'exception de ceux identifiés comme moribonds et/ou euthanasiés avant la fin de l'étude) dont on prélèvera le foie, les reins, les glandes surrénales, le thymus, la rate, le cerveau et le cœur, débarassés de tout tissu adhérent si nécessaire, et seront pesés aussitôt après dissection afin d'éviter toute déshydratation. Les tissus ci-après seront prélevés pour les conserver dans le milieu de fixation le plus approprié, en fonction du type de tissu et des examens histopathologiques que l'on entend effectuer: toutes les lésions importantes, le cerveau (les régions représentatives comportant l'encéphale, le cervelet et la protubérance annulaire), la moelle épinière, l'œil, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin (y compris les plaques de Peyer), le foie, les reins, les surrénales, la rate, le cœur, le thymus, la trachée et les poumons (qui seront conservés par injection d'un fixateur suivie d'une immersion), les gonades (testicules et ovaires), les organes sexuels accessoires (utérus et col de l'utérus, épididymes, prostate, vésicule séminales et glandes coagulantes), le vagin, la vessie, les ganglions lymphatiques (le ganglion lymphatique le plus proximal et un autre, en fonction de l'expérience du laboratoire(16)), un nerf périphérique (le sciatique ou le tibial) de préférence tout près du muscle, unmuscle squelettique et un os, avec la moelle osseuse (coupe ou à défaut une ponction examinée immédiatement). Il est recommandé de fixer les testicules par immersion dans un fixateur de Bouin ou de Davidson modifié (16) (7) (18); la fixation au formol est déconseillée pour ces tissus. La tunique albuginée peut être perforée en douceur et de façon superficielle aux deux pôles de l'organe avec une aiguille permettant une pénétration rapide du liquide de fixation. Les résultats des observations cliniques et des autres observations pourraient inciter à l'examen d'autres tissus. On devrait également conserver tout autre organe considéré comme étant susceptible d'être un organe cible d'après les propriétés connues du produit chimique d'essai.

66. Les tissus suivants peuvent apporter des informations utiles sur les effets endocriniens: gonades (ovaires et testicules), organes sexuels accessoires (utérus et col de l'utérus, épididymes, vésicules séminales et glande coagulante, prostate dorsolatérale et ventrale), vagin, hypophyse, glande mammaire mâle et glande surrénale. Les changements survenant dans les glandes mammaires mâles n'ont pas encore été insuffisamment documentés, mais ce paramètre peut s'avérer très sensible aux substances à action oestrogénique. L'observation des organes/tissus non cités au paragraphe 65 est facultative.

67. Les petits morts ainsi que ceux qui sont sacrifiés au 13ème jour post partum, ou peu après, doivent être au moins soumis à un examen externe rigoureux visant à déterminer d'éventuelles anomalies flagrantes. Une attention particulière devra être apportée aux organes génitaux reproducteurs externes, pour lesquels on recherchera des signes de modification de leur développement.

Histopathologie

68. On doit effectuer un examen histopathologique approfondi des organes et des tissus conservés et prélevés sur les animaux choisis dans le groupe témoin et dans le groupe exposé à de fortes doses (en mettant l'accent sur les phases de spermatogénèse dans les gonades mâles et sur l'examen histopathologique des structures cellulaires interstitielles des testicules). La glande thyroïde des petits et des animaux adultes restants pourra être examinée si nécessaire. Au cas où l'on observerait des modifications liées au traitement dans le groupe exposé à des doses élevées, il convient d'étendre ces examens à des animaux des autres groupes traités. Le document d'orientation sur l'histopathologie (10) donne plus de détails sur la dissection, la fixation, la section et l'histopathologie des tissues endocriniens.

69. Toutes les lésions importantes doivent être examinées. Afin d'aider à définir la concentration sans effet nocif observé (CSENO), il conviendra d'examiner des organes cibles dans d'autres groupes exposés, en particulier dans les groupes correspondant à des niveaux de dose égaux ou inférieurs à la CSENO.

▼M8

70. En cas d'utilisation d'un groupe satellite, les examens histopathologiques doivent être effectués sur des tissus et des organes sur lesquels des effets ont été décelés dans les groupes traités.

RESULTATS ET RAPPORT

Résultats

71. Des données individuelles sont à fournir pour chaque animal. Elles doivent en outre être présentées sous la forme d'un tableau indiquant pour chaque groupe étudié le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux morts au cours de l'essai ou euthanasiés, ainsi que le moment de la mort ou de l'euthanasie, le nombre d'animaux fertiles, le nombre de femelles gravides, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, une description des signes de toxicité observés, comprenant le moment du déclenchement, la durée et la gravité des effets toxiques éventuels, les types de modifications histopathologiques, ainsi que toutes les informations dignes d'intérêt concernant les portées. On trouvera à l'annexe 3 un modèle de rapport succinct sous forme de tableau qui s'avère très utile pour l'évaluation des effets sur la reproduction et le développement.

72. Chaque fois que c'est possible, les résultats numériques devraient être évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée et généralement acceptée. Les comparaisons de l'effet en fonction de la dose utilisée ne devront pas utiliser de tests-t multiples. Les méthodes statistiques utilisées devraient être choisies lors de la conception de l'étude. L'analyse statistique de la DAG et de persistance du mamelon doit être basée sur les données individuelles des petits, en prenant en compte les effets sur la portée. S'il y a lieu, l'unité d'analyse sera la portée. L'analyse statistique du poids corporel des petits doit être basée sur les données individuelles des petits, en prenant en compte la taille de la portée. Compte tenu de la portée restreinte de l'étude, l'analyse statistique visant à vérifier le caractère significatif des résultats n'a qu'une valeur limitée pour de nombreux effets observés, notamment les effets sur la reproduction. Certaines des méthodes les plus couramment utilisées, notamment les tests paramétriques pour mesurer la tendance centrale sont inappropriées. Si une analyse statistique est réalisée, la méthode retenue doit convenir à la distribution de la variable examinée et doit être arrêtée préalablement à la mise en route de l'étude.

Évaluation des résultats

73. Les résultats de cette étude sur la toxicité doivent être évalués en fonction des effets observés, de l'autopsie et des données microscopiques. L'évaluation portera notamment sur le lien entre, d'une part, la dose du produit chimique d'essai et, d'autre part, la présence ou l'absence, l'incidence et la gravité des anomalies, y compris les lésions grossières, les organes cibles désignés, l'infertilité, les anomalies cliniques, l'action sur la reproduction et les portées, les modifications du poids corporel, les effets sur la mortalité et tout autre effet toxique.

74. La période de traitement du mâle étant de courte durée, l'histopathologie des testicules et des épididymes doit aller de pair avec les données sur la fertilité dans le cadre de l'évaluation des effets sur la reproduction chez le mâle. L'utilisation des données des témoins historiques pour la reproduction/développement (par exemple pour la taille des portées, DAG, persistance du mamelon, taux sériques de T4), pourrait, le cas échéant, s'avérer être une aide utile pour l'interprétation des données.

75. Pour le contrôle de la qualité, il est proposé que les données des témoins historiques soient collectées et que les coefficients de variation soient calculés dans le cas de données numériques, tout particulièrement pour les paramètres en lien avec la détection de perturbateurs endocriniens. Ces données peuvent être utilisées à des fins de comparaison quand les études sont évaluées.

▼**M8**

Rapport

76. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Produit chimique d'essai:

— source, numéro de lot, date limite d'utilisation si c'est disponible;

— stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue.

Substance mono-constituant:

— apparence physique, hydro-solubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude;

— identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges:

— caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants.

Véhicule (s'il y a lieu):

— raisons justifiant le choix du véhicule lorsqu'il ne s'agit pas d'eau.

Animaux soumis à l'essai:

— espèce et souche;

— nombre, sexe et âge des animaux;

— origine, conditions d'encagement, type d'alimentation, etc.;

— poids de chaque animal au début de l'essai;

— justification de l'espèce si l'espèce choisie n'est pas le rat.

Conditions de l'essai:

— critères de choix des niveaux de doses;

— précisions concernant la formulation du produit chimique d'essai et de la préparation de l'alimentation, la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation;

— description détaillée de l'administration du produit chimique d'essai;

— conversion de la concentration du produit chimique d'essai dans la nourriture ou l'eau (ppm) en dose effective (mg/kg de poids corporel/jour), le cas échéant;

— précisions concernant la qualité des aliments et de l'eau;

— description détaillée des protocoles de randomisation utilisés pour sélectionner les petits éliminés de la portée, s'il y a eu élimination.

Résultats:

— modifications du poids corporel;

— données relatives à la consommation d'aliments et d'eau, le cas échéant;

▼**M8**

— données sur les effets toxiques provoqués en fonction du sexe et de la dose, concernant notamment la fertilité, la gestation et tout autre signe de toxicité;

— durée de la gestation;

— effets toxiques ou autres sur la reproduction, la progéniture, la croissance post-natale, etc.;

— nature, gravité et durée des manifestations cliniques observées (réversibles ou non);

— évaluations de l'activité sensorielle, de la force de préhension et de l'activité motrice;

— analyses de sang et valeurs normales de référence;

— analyses de biochimie clinique et valeurs normales de référence;

— nombre de femelles adultes présentant un cycle œstral normal ou anormal et durée du cycle;

— nombre de petits vivants à la naissance et pertes après implantation;

— nombre de petits présentant des anomalies évidentes, évaluation macroscopique des organes génitaux externes, nombre d'avortons;

— indication du moment de la mort survenue pendant l'étude, ou si l'animal a survécu jusqu'à la fin;

— nombre d'embryons implantés, taille et poids des portées au moment de la consignation de ces données;

— données relatives au poids corporel des petits;

— DAG de tous les petits (et poids corporel le jour de la mesure de la DAG);

— persistance du mamelon chez les petits mâles;

— taux d'hormones thyroïdiennes chez les petits âgés de 13 jours et les mâles adultes (ainsi que chez les mères et chez les petits âgés de 4 jours si cela a été mesuré);

— poids corporel lors du sacrifice et poids des organes des animaux de la génération parentale;

— résultats de l'autopsie;

— description détaillée de l'examen histopathologique;

— données sur l'absorption (si elles sont disponibles);

— traitement statistique des résultats, le cas échéant.

Examen des résultats.

Conclusions.

▼M8

Interprétation des résultats

77. L'étude permettra d'évaluer la toxicité pour la reproduction et le développement liée à l'administration de doses répétées. Puisque l'accent est mis à la fois sur la toxicité générale et sur les effets toxiques sur la reproduction et le développement, les résultats de l'étude permettront de faire une distinction entre les effets toxiques pour la reproduction et pour le développement se produisant en l'absence de toxicité générale et les effets qui ne s'expriment qu'à des niveaux qui sont également toxiques pour les parents (voir paragraphes 7-11). Elle pourrait aider à déterminer s'il y a lieu d'approfondir les recherches et fournir des orientations pour la conception d'études ultérieures. Le document d'orientation n° 43 de l'OCDE devra être consulté pour aider à l'interprétation des résultats liés à la reproduction et au développement (19). Le document d'orientation n° 106 de l'OCDE sur l'évaluation histologique des essais endocriniens et de reproduction chez les rongeurs (16) fournit des informations sur la préparation et l'évaluation des organes (endocriniens) et des frottis vaginaux; ces informations peuvent être utiles dans le cadre de la présente méthode d'essai.

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation de coopération et de développement économiques, Paris

(2) OCDE (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Disponible sur demande auprès de l'Organisation de coopération et de développement économiques, Paris

(3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. and Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). J. *Toxicol*, Sci., 19, 141-149.

(4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. and Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. Fundam. Appl. *Toxicol*., 18, 89-95.

(5) OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, Disponible sur demande auprès de l'Organisation de coopération et de développement économiques, Paris

(6) OCDE (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(7) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

▼**M8**

(8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M.and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

(9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No 60).

(11) Moser V.C., McDaniel K.M. and Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol*. Appl. *Pharmacol*., 108, 267-283.

(12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. and Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. *Toxicol*., 1, 233-236.

(13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609.

(14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds. (1999). «Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights», Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(15) OCDE (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(16) OCDE (2009).Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106) Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(17) Hess RA and Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(18) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol*. 30, 524-533.

(19) OCDE (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(20) OCDE (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

▼**M8**

Appendice 1

DÉFINITIONS (VOIR AUSSI LE DOCUMENT D'ORIENTATION N° 150 DE L'OCDE (20))

Androgénicité capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone androgénique naturelle (par exemple la testostérone) chez un organisme mammifère.

Antiandrogénicité capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone androgénique naturelle (par exemple la testostérone) chez un organisme mammifère.

Antioestrogenicité capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone oestrogénique naturelle (par exemple le 17β-oestradiol) chez un organisme mammifère.

Activité antithyroïdienne capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone thyroïdienne naturelle (par exemple T_3) chez un organisme mammifère.

Produit chimique une substance ou un mélange.

Toxicité pour le développement prolongement de la toxicité pour la reproduction, qui se traduit pour la progéniture par des perturbations prénatales, périnatales, post-natales, structurelles ou fonctionnelles.

Dose quantité de produit chimique d'essai administrée, exprimée en poids (g, mg) ou en poids par unité de poids de l'animal soumis à l'essai (mg/kg, par exemple), ou encore en concentration dans l'aliment (ppm).

Détermination des doses notion générale englobant la dose, ainsi que la fréquence et la durée d'administration.

Toxicité évidente notion générale qui renvoie aux signes incontestables de toxicité consécutifs à l'administration de la substance d'essai. Ceux-ci doivent être suffisants pour permettre d'évaluer le danger et se manifester de telle manière qu'une augmentation de la dose administrée se traduira selon toute vraisemblance par l'apparition de signes de grave toxicité conduisant probablement à la mort.

Altération de la fertilité: perturbation des fonctions ou de la capacité de reproduction chez le mâle ou chez la femelle.

:Toxicité pour la femelle gravide effets défavorables sur la femelle gravide, spécifiques (effets directs) ou non (effets indirects), et liés à la gestation.

CSENO concentration sans effet nocif observé. C'est la dose la plus élevée pour laquelle on n'observe aucun effet dommageable lié au traitement.

Oestrogénicité c'est la capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone naturelle oestrogénique (par exemple le 17β-oestradiol) chez un organisme mammifère.

Toxicité pour la reproduction effets préjudiciables sur la progéniture ou altération des fonctions ou de la capacité de reproduction chez le mâle et chez la femelle.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

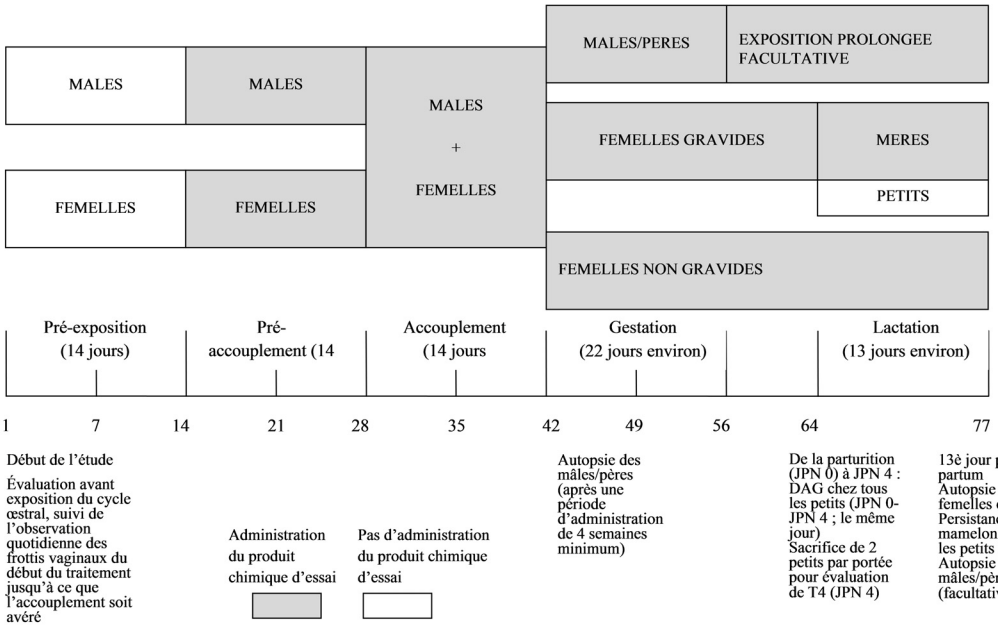
Activité thyroïdiennec'est la capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone thyroïdienne naturelle (par exemple T_3) chez un organisme mammifère.

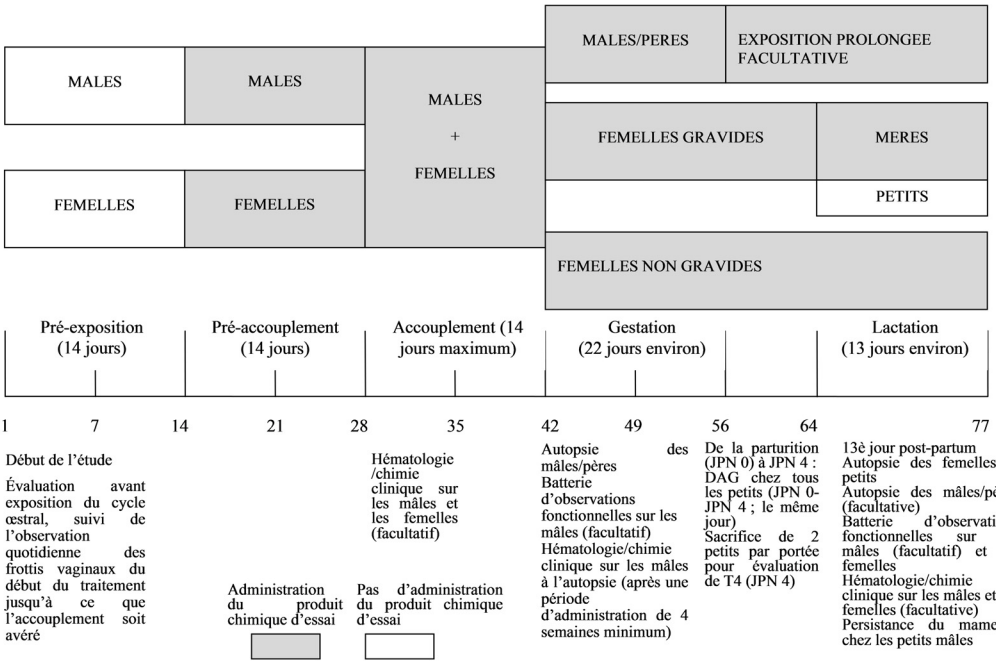
Validation processus scientifique visant à caractériser les exigences opératoires et les limites d'une méthode de test et à en démontrer la fiabilité et la pertinence pour un objectif particulier.

▼**M8**

Appendice 2

REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU PROGRAMME D'ESSAI INDIQUANT LA DURÉE MAXIMALE DE L'ÉTUDE, POUR UNE PÉRIODE D'ACCOUPLEMENT COMPLÈTE DE 14 JOURS





▼**M8**

Appendice 3

TABLEAU RÉCAPITULATIF DES EFFETS SUR LA REPRODUCTION ET LE DÉVELOPPEMENT

OBSERVATIONS	VALEURS				
Dose administrée (unités)…….	0 (témoin)	…	…	…	…
Couples formés (N)					
Cycle œstral (au moins durée moyenne et fréquence de cycles irréguliers)					
Femelles présentant signes d'accouplement (N)					
Femelles gravides (N)					
Jours conception 1-5 (N)					
Jours conception 6-… ([1]) (N)					
Gestation ≤ 21 jours (N)					
Gestation = 22 jours (N)					
Gestation ≥ 23 jours (N)					
Mères ayant mis bas petits vivants (N)					
Mères ayant petits vivants au 4ème jour post partum (N)					
Embryons implantés/mère (moyenne)					
Petits vivants/mère à la naissance (moyenne)					
Petits vivants/mère au 4ème jour post partum (moyenne)					
Rapport mâles/femelles à la naissance (moyenne)					
Rapport mâles/femelles au 4ème jour post partum (moyenne)					
Poids des portées à la naissance (moyenne)					
Poids des portées au 4ème jour post partum (moyenne)					
Poids des petits à la naissance (moyenne)					
Poids des petits au moment de la mesure de la DAG (moyenne des mâles, moyenne des femelles)					
DAG des petits mesurée le même jour post natal, entre la naissance et JPN 4 (moyenne des mâles, moyenne des femelles, noter le JPN)					
Poids des petits au 4ème jour post partum (moyenne)					
Poids des petits au 13ème jour post partum (moyenne)					

▼M8

OBSERVATIONS	VALEURS				
Persistance du mamelon chez les petits mâles au jour 13 post partum (moyenne)					
PETITS PRESENTANT DES ANOMALIES					
Mères affectées par 0					
Mères affectées par 1					
Mères affectées par ≥ 2					
PERTES DE DESCENDANCE					
Pertes prénatales/après implantation (embryons implantés moins petits vivants à la naissance)					
Femelles affectées par 0					
Femelles affectées par 1					
Femelles affectées par 2					
Femelles affectées par ≥ 3					
Pertes post-natales (Petits vivants à la naissance moins petits vivants au 13ème jour post partum)					
Femelles affectées par 0					
Femelles affectées par 1					
Femelles affectées par 2					
Femelles affectées par ≥ 3					

([1]) dernier jour de la période d'accouplement

▼M8

B.65. MÉTHODE D'ESSAI *IN VITRO* SUR MEMBRANE D'ÉTANCHÉITÉ POUR LA CORROSION CUTANÉE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice435 (2015) de l'OCDE. La corrosion cutanée désigne la survenue de lésions irréversibles de la peau, qui se manifestent sous forme de nécroses visibles dans l'épiderme et jusque dans le derme, après application d'un produit chimique d'essai, tel que défini par le Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations-Unies (ONU) (1) et le règlement (CE) n° 1272/2008 de l'Union européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (ci-après le «règlement CLP» ([1]). Cette méthode d'essai, équivalente à la ligne directrice 435 mise à jour de l'OCDE propose une méthode d'essai *in vitro* sur membrane d'étanchéité qui peut être utilisée pour identifier les produits chimiques corrosifs. La méthode d'essai emploie une membrane artificielle conçue pour réagir au traitement par des produits chimiques de façon similaire à de la peau d'animaux vivants.

2. La corrosivité cutanée est habituellement évaluée en appliquant le produit chimique testé sur la peau d'animaux vivants et en déterminant l'ampleur de la lésion tissulaire après un intervalle de temps donné (2). Outre la présente méthode d'essai, un certain nombre de méthodes in vitro ont été adoptées comme alternatives (3) (4) à la méthode standard in vivo sur lapin (Chapitre B.4 de la présente annexe, équivalent à la ligne directrice 404) utilisée pour identifier les produits chimiques corrosifs (2). La stratégie d'essai et d'évaluation à plusieurs niveaux du SGH de l'ONU pour l'estimation et la classification de la corrosivité cutanée, ainsi que le document Guide de l'OCDE sur les Approches Intégrées sur les Essais et l'Évaluation (IATA) pour l'irritation et la corrosion de la peau autorise l'utilisation de procédés d'essai *in vitro* validés et acceptés tels que décrits dans les modules 3 et 4 (1) (5). Le Document guide IATA décrit plusieurs modules qui rassemblent les sources d'information et les outils d'analyse et (i) fournit des orientations sur la façon d'intégrer et d'utiliser les données d'essais et autres données pour l'évaluation du potentiel d'irritation ou de corrosion de la peau des produits chimiques d'essai et (ii) propose une approche quand des essais supplémentaires sont requis, y compris quand des résultats négatifs sont obtenus (5). Grâce à cette approche modulaire, les résultats positifs de méthodes d'essai *in vitro* peuvent servir à classer un produit chimique dans la catégorie corrosive sans impliquer d'essais sur les animaux, ce qui réduit et optimise l'usage des animaux et évite la douleur et les souffrances infligées aux animaux concernés.

3. Des études de validation du modèle *in vitro* de membrane d'étanchéité disponible dans le commerce sous l'appellation Corrositex® (6)(7)(8) ont été réalisées, démontrant une précision de 79 % pour la prédiction de la corrosivité de la peau (128/163), une sensibilité de 85 % (76/89), et une spécificité de 70 % (52/74) pour une base de données de 163 produits chimiques (substances et mélanges) (7). Une fois la validité de cette méthode de référence (MRV) reconnue, son utilisation a été recommandée dans le cadre d'une stratégie d'essai à plusieurs niveaux pour évaluer le risque potentiel de corrosion dermique engendré par des produits chimiques (5) (7). Préalablement à l'utilisation d'un modèle *in vitro* de membrane d'étanchéité pour évaluer la corrosion cutanée à des fins réglementaires, il convient de déterminer sa fiabilité, sa pertinence (précision) et ses limites afin de garantir son équivalence à celle de la MRV (9), en accord avec les standards de performances pré-définis (10). L'acceptation mutuelle des données ne sera garantie qu'après examen et intégration de toute méthode

([1]) Règlement (EC) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 rel atif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006, JO L 353 du 31.12.2008, p. 1.

▼M8

d'essai nouvelle ou actualisée proposée et conforme aux normes de performance dans la méthode d'essai équivalente de l'OCDE. Actuellement, la ligne directrice 435 de l'OCDE et la présente méthode d'essai ne couvrent qu'une seule méthode in vitro: le modèle Corrositex®, disponible dans le commerce.

4. D'autres méthodes pour les essais de corrosion cutanée se basent sur l'utilisation de peau humaine reconstituée (ligne directrice 431 de l'OCDE) (3) et de la peau de rat isolée (ligne directrice 430 de l'OCDE) (4). La présente méthode d'essai permet également de sous-catégoriser les produits chimiques corrosifs en trois sous-catégories du SGH et dans les trois groupes d'emballage ONU pour les transports pour le risque de corrosivité. Cette méthode d'essai a été adoptée initialement en 2006, et mise à jour en 2015 pour faire référence au Document guide IATA, et mettre à jour la liste des substances d'épreuve de compétence.

DÉFINITIONS

5. Les définitions utilisées figurent dans l'appendice.

CONSIDÉRATIONS INITIALES ET LIMITATIONS

6. L'essai décrit dans cette méthode d'essai permet d'identifier les substances et mélanges chimiques corrosifs et de les classer en sous-catégories de substances corrosives conformément au SGH de l'ONU/CLP (tableau 1) (1). Ce procédé d'essai peut également contribuer aux décisions prises sur la corrosivité et la non corrosivité de classes spécifiques de produits chimiques, par exemple, les acides organiques et minéraux, les dérivés acides ([1]), et les bases dans certainscas d'essais de transport (7)(11)(12). La présente méthode d'essai décrit un protocole générique similaire à un procédé d'essai de référence validé (7). Si la présente méthode d'essai ne fournit pas de données adéquates pour l'irritation de la peau, il convient de noter en revanche que la méthode d'essai B.46 (équivalente à la méthode d'essai 439 de l'OCDE) concerne spécifiquement l'irritation cutanée *in vitro* (13). Pour effectuer une évaluation complète des effets locaux sur la peau faisant suite à une exposition cutanée unique, le Document guide n° 203 sur IATA doit être consulté (5).

Tableau 1

La catégorie et les sous-catégories de corrosivité cutanée du SGH de l'ONU ([1])

Catégorie de corrosivité (catégorie 1) (pour les autorités qui n'utilisent pas de sous-catégories)	Sous-catégories ([1]) éventuelles de corrosivité (pour les autorités qui utilisent des sous-catégories, y compris le règlement CLP)	Corrosives chez ≥ 1 sur 3 animaux	
		Exposition	Observation
Corrosive	Sous-catégorie corrosive 1A	≤ 3 minutes	≤ 1 heure
	Sous-catégorie corrosive 1B	> 3 minutes / ≤ 1 heures	≤ 14 jours
	Sous-catégorie corrosive 1C	> 1 heure / ≤ 4 heures	≤ 14 jours

([1]) Dans le cas de l'UE, le règlement CLP applique les trois sous-catégories de corrosion cutanée 1A, 1B et 1C.

7. La méthode de référence validée (7) comporte une limite par rapport à de nombreux produits chimiques non-corrosifs et certains produits chimiques corrosifs pour lesquels la méthode ne pourra pas s'appliquer, selon les résultats de l'essai de compatibilité initial (voir paragraphe 13). Les produits

([1]) «Dérivé acide» est une désignation de classe non spécifique et est largement défini comme un acide produit à partir d'une substance chimique directement ou par modification ou substitution partielle. Cette classe comprend les anhydrides, les acides halogénés, les sels et d'autres types de produits chimiques.

▼M8

chimiques aqueux dont le pH est compris dans l'intervalle de 4,5 à 8,5, se prêtent rarement à l'essai; toutefois, 85 % des produits chimiques d'essai dans cet intervalle de pH n'étaient pas corrosifs dans les essais sur animaux (7). La méthode in vitro sur membrane d'étanchéité peut être utilisée pour tester des matières solides (solubles ou insolubles dans l'eau), des liquides (aqueux ou non aqueux) et des émulsions. Néanmoins, les produits chimiques d'essai qui ne provoquent pas de modifications détectables dans l'essai de compatibilité (c'est-à-dire un changement de couleur dans le système de détection chimique (CDS) du procédé d'essai de référence validé) ne peuvent être testés par la méthode sur membrane d'étanchéité et il faudra donc recourir à d'autres méthodes d'essais.

PRINCIPE DE L'ESSAI

8. Le système d'essai comporte deux éléments, une membrane biologique macromoléculaire synthétique et un CDS; le procédé d'essai est fondé sur la détection par le CDS de dommages provoqués par des produits chimiques d'essai corrosifs sur la membrane d'étanchéité après l'application du produit chimique d'essai sur la surface de la membrane d'étanchéité macromoléculaire synthétique (7), dommages vraisemblablement dus à un ou des mécanismes de corrosion similaire à ceux qui agissent sur la peau vivante.

9. Il convient de mesurer la pénétration de la membrane d'étanchéité (ou sa percée) par plusieurs protocoles ou CDS, en particulier un changement de couleur d'un colorant indicateur de pH ou d'une quelconque autre propriété de la solution indicatrice située sous la barrière.

10. La validité de la membrane d'étanchéité, c'est-à-dire sa pertinence et sa fiabilité, doit être déterminée pour l'utilisation prévue. Il faut ainsi s'assurer que les différentes préparations confèrent effectivement des propriétés d'étanchéité, par exemple, qu'elles sont capables de maintenir une barrière contre des produits chimiques non corrosifs, et aptes à classer des propriétés corrosives des produits chimiques en diverses sous-catégories de corrosivité du SGH de l'ONU (1). La classification attribuée dépend du temps nécessaire à un produit chimique pour pénétrer la membrane d'étanchéité jusqu'à la solution indicatrice.

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

11. Avant d'appliquer en routine la méthode *in vitro* sur membrane d'étanchéité, conformément à la présente méthode d'essai, les laboratoires doivent faire la preuve de leur compétence technique en classifiant correctement les douze produits énumérés au tableau 2. Dans le cas où une substance figurant dans le tableau 2 serait indisponible, où dans d'autres cas où il est justifié de la remplacer par une autre substance (par exemple à partir de la liste de substances de référence (10)), cette autre substance peut être utilisée si des données de référence appropriées *in vivo* et *in vitro* sont disponibles, et dans la mesure où les mêmes critères de sélection que ceux décrits sous le tableau 1 sont utilisés.

Tableau 2

Liste des produits chimiques d'épreuve de compétence [1]

Produit chimique [2]	Numéro CAS	Classe chimique	Sous-Cat. SGH de l'ONU d'après les résultats *in vivo* [3]	Sous-Cat SGH de l'ONU d'après les résultats *in vitro* [3]
Trifluorure de bore dihydraté	13319-75-0	acide inorganique	1A	1A
Acide nitrique	7697-37-2	acide inorganique	1A	1A
Pentachlorure de phosphore	10026-13-8	Précurseur d'acide organique	1A	1A
Chlorure de valeryle	638-29-9	Chlorure d'acide	1B	1B
Hydroxyde de sodium	1310-73-2	Base inorganique	1B	1B

▼M8

Produit chimique ([2])	Numéro CAS	Classe chimique	Sous-Cat. SGH de l'ONU d'après les résultats *in vivo* ([3])	Sous-Cat SGH de l'ONU d'après les résultats *in vitro* ([3])
1-(2-Aminoethyl) pipérazine	140-31-8	Amine aliphatique	1B	1B
Chlorure de benzène-sulfonyle	98-09-9	Chlorure d'acide	1C	1C
N,N-diméthyle benzylamine	103-83-3	Aniline	1C	1C
Tetraéthylène pentamine	112-57-2	Amine aliphatique	1C	1C
Eugénol	97-53-0	Phenol	NC	NC
Acrylate de nonyle	2664-55-3	Acrylate/méthacrylates	NC	NC
Bicarbonate de soude	144-55-8	Sel inorganique	NC	NC

([1]) La liste des douze produits chimiques présentée ci-dessus contient trois substances de chacune des trois sous-catégories du SGH pour les substances corrosives, et trois substances non corrosives, toutes disponibles dans le commerce; la sous-catégoriation selon de SGH de l'ONU se base sur des résultats *in vivo* de bonne qualité. Ces substances sont extraites de la liste de 40 substances de référence inclus dans la liste minimale des produits chimiques identifiés pour démontrer la précision et la fiabilité des méthodes d'essai de structure et de fonction similaires à la MRV, et ont été sélectionnnées à partir de 163 produits chimiques de référence initialement utilisés pour la validation de la MRV (Corrositex® (7) (10) (14). Le but de cette sélection était d'inclure, dans la mesure du possible, des substances qui: (i) sont représentatives de la gamme des réactions de corrosion provoquées (par exemple non corrosives; groupe d'emballage I, II, III de l'ONU) que les MRV sont capables de mesurer ou de prévoir; (ii) sont représentatives des classes chimiques utilisées dans les études de validation; (iii) ont une structure chimique bien définie; (iv) permettent d'obtenir des résultats reproductibles avec la MRV; (v) permettent d'obtenir des résultats définitifs avec la méthode d'essai *in vivo* de référence; (vi) sont disponibles dans le commerce et (vii) ne sont pas associées à des coûts d'élimination prohibitifs.

([2]) Substances testées pures ou avec une pureté ≥ 90 %.

([3]) Les groupes d'emballage de l'ONU correspondants sont les groupes I, II et III respectivement pour les sous-catégories 1A, 1B et 1C du SGH de l'ONU.

PROTOCOLE

12. Les paragraphes suivants proposent une description des composants et des protocoles d'un procédé d'essai sur membrane d'étanchéité artificielle pour l'évaluation de la corrosivité (7) (15), sur la base de la MRV, i.e. la méthode commercialement disponible Corrositex®. La membrane d'étanchéité et les solutions de compatibilité et indicatrices ainsi que les solutions permettant la catégorisation peuvent être produites, préparées ou obtenues dans le commerce, comme dans le cas de la MRV Corrositex®. Un exemple de protocole de procédé d'essai sur échantillon du procédé d'essai de référence validé est disponible (7). L'essai doit être effectué à température ambiante (17-25 °C) et les composants doivent se conformer aux critères suivants.

Essai de compatibilité du produit chimique d'essai

13. Avant de procéder à l'essai sur membrane d'étanchéité, un essai de compatibilité est mis en œuvre afin de déterminer si le produit chimique d'essai est détectable par le CDS. Si ce n'est pas le cas, le procédé d'essai sur membrane d'étanchéité ne convient pas à l'évaluation de la corrosivité potentielle de ce produit chimique d'essai particulier et il conviendra d'utiliser un autre procédé d'essai. Le CDS et les conditions d'exposition employés pour l'essai de compatibilité doivent reproduire l'exposition subie dans le futur essai sur membrane d'étanchéité.

Essai de catégorie d'échelle de temps du produit chimique d'essai

14. Si le procédé d'essai le permet, un produit chimique d'essai qualifié par l'essai de compatibilité peut également subir un essai de catégorie d'échelle de temps, c'est-à-dire un criblage permettant de distinguer entre acides ou bases faibles et forts. Par exemple, dans le procédé d'essai de référence validé, un essai de catégorie d'échelle de temps permet de définir l'une

▼M8

des deux échelles de temps à utiliser selon que l'on détecte une réserve acide ou alcaline significative (pouvoir tampon). Il convient d'utiliser deux échelles de temps de percée différentes pour déterminer la corrosivité et la sous-catégorie de corrosivité cutanée du SGH de l'ONU, en fonction de la réserve acide ou alcaline du produit chimique d'essai.

ÉLÉMENTS DU PROCÉDÉ D'ESSAI SUR MEMBRANE D'ÉTANCHÉITÉ

Membrane d'étanchéité

15. La membrane d'étanchéité comprend deux éléments: un gel aqueux macromoléculaire protéique et une membrane de support perméable. Le gel protéique doit être étanche aux liquides et aux solides, mais susceptible d'être corrodé et perméabilisé. Il convient de stocker la membrane d'étanchéité terminée dans des conditions prédéfinies afin d'éviter la détérioration du gel, par exemple, par séchage, croissance microbienne, déplacement des couches, craquelures, qui pourraient nuire à ses performances. On déterminera une période de stockage acceptable et les préparations de membranes d'étanchéité ne seront plus utilisées au-delà.

16. La membrane de support perméable assure un soutien mécanique au gel protéique pendant le processus de gélification et l'exposition au produit chimique d'essai. La membrane de support doit prévenir tout affaissement ou déplacement du gel et être aisément perméable à tout produit chimique d'essai.

17. Le gel protéique, composé de protéines, par exemple, kératine, collagène ou mélanges de protéines qui forment une matrice de gel, sert de cible pour le produit chimique d'essai. Le matériau protéique est placé sur la surface de la membrane de support et se gélifie avant la pose de la membrane d'étanchéité sur la solution indicatrice. L'épaisseur et la densité du gel protéique doivent être uniformes, et le matériau doit être exempt de bulles d'air et de défauts qui pourraient affecter son intégrité fonctionnelle.

Système de détection chimique (CDS)

18. La solution indicatrice, identique à celle utilisée pour l'essai de compatibilité, doit répondre à la présence d'un produit chimique d'essai. On peut employer un colorant ou une combinaison de colorants indicateurs de pH, par exemple du rouge crésol et de l'orange méthyl, qui change de couleur en présence du produit chimique d'essai. Le système de mesure peut être visuel ou électronique.

19. Il convient d'évaluer la pertinence et la fiabilité des systèmes de détection développés pour détecter le passage du produit chimique testé à travers la membrane d'étanchéité afin de définir la gamme de produits chimiques d'essai susceptible d'être détecté et les limites quantitatives de détection.

MISE EN ŒUVRE DE L'ESSAI

Assemblage des éléments de la méthode d'essai

20. La membrane d'étanchéité est placée dans un flacon (ou un tube) contenant la solution indicatrice de telle sorte que la membrane support soit entièrement au contact de la solution indicatrice en l'absence de toute bulle d'air. On s'assurera du maintien de l'intégrité de la membrane.

▼M8

Application du produit chimique d'essai

21. Une quantité appropriée du produit chimique d'essai, par exemple 500 µl d'un liquide ou 500 mg d'un solide finement pulvérisé (7), est soigneusement déposée sur la surface supérieure de la membrane d'étanchéité et uniformément répartie. Un nombre approprié de répliques, par exemple quatre (7), est préparé pour chaque produit chimique d'essai et ses témoins correspondants (voir paragraphes 23 à 25). La durée d'application du produit chimique d'essai à la membrane d'étanchéité est notée. Pour garantir un enregistrement précis des courtes durées de corrosion, les durées d'application du produit chimique d'essai dans les flacons des répliques sont échelonnées.

Mesure des pénétrations dans la membrane d'étanchéité

22. Chaque flacon est contrôlé de manière adéquate et le moment auquel intervient le premier changement dans la solution indicatrice, c'est-à-dire la pénétration de la membrane d'étanchéité, est noté, et la durée écoulée entre l'application et la pénétration de la membrane d'étanchéité déterminée.

Contrôles

23. Dans les essais qui requièrent l'utilisation d'un véhicule ou d'un solvant avec le produit chimique d'essai, ceux-ci doivent être compatibles avec le système de membrane d'étanchéité, c'est-à-dire ne pas nuire à l'intégrité du système de membrane d'étanchéité et ne pas modifier la corrosivité du produit chimique d'essai. Le cas échéant, un témoin de solvant (ou de véhicule) sera soumis à l'essai en même temps que le produit chimique testé afin de démontrer la compatibilité du solvant avec le système de membrane d'étanchéité.

24. Il convient également de soumettre simultanément à l'essai le produit chimique d'essai et un produit chimique témoin positif (corrosif) dont l'activité de corrosion est intermédiaire, par exemple, 110±15 mg hydroxyde de sodium (sous-catégorie de corrosivité 1B du SGH de l'ONU) (7), afin de vérifier que les performances du système d'essai sont acceptables. Il peut être utile d'inclure un second témoin positif de même classe chimique que le produit chimique d'essai pour évaluer le potentiel de corrosivité relatif d'un produit chimique d'essai corrosif. On choisira un ou plusieurs témoins positifs de corrosivité intermédiaire (sous-catégorie 1B du SGH de l'ONU) de manière à déterminer des changements de durée de pénétration éventuellement trop longs ou trop courts par rapport à la valeur de référence établie, et qui signalent par conséquent un fonctionnement incorrect du système d'essai. A cette fin, les produits chimiques extrêmement corrosifs (sous-catégorie 1A du SGH de l'ONU) ou non corrosifs n'ont qu'une utilité limitée. Un produit chimique corrosif de sous-catégorie 1B du SGH de l'ONU doit permettre la détection d'une durée de percée trop courte ou trop longue. Il est possible d'employer un produit chimique faiblement corrosif (sous-catégorie 1C du SGH de l'ONU) comme témoin positif pour mesurer l'aptitude du procédé d'essai à distinguer systématiquement les produits chimiques faiblement corrosifs des produits chimiques non corrosifs. Quelle que soit l'approche utilisée, il est nécessaire de définir un intervalle acceptable de réponses des témoins positifs fondé sur l'intervalle historique des durées de percée du ou des témoins positifs employés, par exemple sous la forme moyenne ± 2-3 écarts types. Dans chaque étude, il convient de déterminer la durée de percée exacte du témoin positif de manière à pouvoir détecter des écarts hors de l'intervalle acceptable.

25. On testera également un témoin négatif (non corrosif), par exemple acide citrique 10 %, acide propionique 6 % (7), parallèlement au produit chimique d'essai pour obtenir une mesure de contrôle de qualité supplémentaire démontrant l'intégrité fonctionnelle de la membrane d'étanchéité.

▼M8

Critères d'acceptabilité de l'étude

26. Conformément aux paramètres de durée établis pour chaque sous-catégorie de corrosivité du SGH de l'ONU, la durée (en minutes) écoulée entre l'application du produit chimique d'essai sur la membrane d'étanchéité et la pénétration de la membrane est utilisée pour prédire la corrosivité du produit chimique d'essai. Pour qu'une étude soit jugée acceptable, le témoin positif correspondant doit donner la durée de réponse de pénétration attendue (par exemple 8-16 min. de temps de pénétration pour l'hydroxyde de soude si cette substance est utilisée comme témoin positif), le témoin négatif correspondant ne doit pas être corrosif et, le témoin de solvant correspondant éventuellement ne doit pas présenter de corrosivité ni altérer le potentiel de corrosivité du produit chimique d'essai. Avant d'introduire l'utilisation en routine d'une méthode conforme à la présente méthode d'essai, les laboratoires devront démontrer leur compétence technique à l'aide des 12 substances recommandées dans le tableau 2. Dans le cas des nouvelles méthodes similaires développées dans le cadre de cette méthode d'essai, qui sont structurellement et fonctionnellement similaires à la méthode de référence validée (14), les normes de performance pré-définies décrites seront utilisées pour démontrer la fiabilité et la précision de la nouvelle méthode avant son application aux essais réglementaires (10).

Interprétation des résultats et classification de corrosivité des produits chimiques d'essai

27. La durée (en minutes) écoulée entre l'application du produit chimique d'essai à la membrane d'étanchéité et la pénétration de la membrane est utilisée pour classer le produit chimique d'essai en sous-catégories de corrosivité selon le SGH de l'ONU (1) et, le cas échéant, dans un groupe d'emballage ONU (16). Les valeurs de durée limites de chacune des trois sous-catégories de corrosivité sont définies pour chaque procédé d'essai proposé. Les décisions ultimes d'établissement des durées limites seront adoptées en s'efforçant de limiter le plus possible la sous-classification du danger de corrosion (c'est-à-dire des faux négatifs). Dans la présente méthode d'essai, les temps limites de la méthode Corrositex® tels que décrits dans le tableau 3 doivent être utilisés car cette méthode est actuellement la seule qui relève de la ligne directrice (7).

Tableau 3

Modèle de prédiction de Corrositex®

Temps de pénétration moyen (min).		Prédiction selon le SGH de l'ONU (3)
Produits chimiques d'essai de catégorie 1 (1) (déterminée par le test de catégorisation de la méthode	Produits chimiques d'essai de catégorie 2 (2) (déterminée par le test de catégorisation de la méthode)	
0-3 min.	0-3 min.	Corrosif, sous-catégorie 1A optionnelle
> 3 à 60 min.	> 3 à 30 min.	Corrosif, sous-catégorie 1B optionnelle
> 60 à 240 min.	> 30 à 60 min.	Corrosif, sous-catégorie 1C optionnelle
> 240 min.	> 60 min.	Non corrosif

(1) Produit chimique d'essai possédant une forte réserve acide ou alcaline (6).
(2) Produit chimique d'essai possédant une faible réserve acide ou alcaline (6).
(3) Sous-catégories 1A, 1B, 1C du SGH de l'ONU correspondant respectivement aux groupes d'emballage I, II et III.

▼**M8**

RÉSULTATS ET RAPPORTS

Résultats

28. La durée (en minutes) écoulée entre l'application et la pénétration de la membrane par le produit chimique d'essai et le ou les témoins positifs est rapportée sous forme de tableaux contenant les résultats individuels de chaque réplique et la moyenne ± écart type pour chaque essai.

Rapport d'essai

29. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Produit chimique d'essai et substances témoins:

— Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent;

— Caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;

— Apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;

— Source et numéro de lot si disponible;

— Traitement du produit chimique d'essai ou de la substance témoin avant la conduite de l'essai, s'il y a lieu (par exemple chauffage, broyage);

— Stabilité du produit chimique d'essai, date de péremption, ou date de vérification analytique si disponible;

— Conditions de stockage.

Véhicule:

— Identification, concentration (s'il y a lieu), volume utilisé;

— Justification pour le choix du véhicule.

Modèle de membrane d'étanchéité in vitro et protocole utilisés, y compris précision et fiabilité démontrées

Conditions d'essais:

— description de l'appareil et des protocoles de préparation utilisés;

— source et composition de la membrane d'étanchéité *in vitro* utilisée;

— composition et propriétés de la solution indicatrice;

— méthode de détection;

— quantités de produit chimique d'essai et de substances témoins;

— nombre de répliques;

— description et justification de l'essai de catégorisation d'échelle de temps;

▼**M8**

— méthode d'application;

— durées d'observation.

— description de l'évaluation de des critères de classification appliqués;

— démonstration de la compétence dans la mise en œuvre de la méthode d'essai avant son utilisation routinière au moyen des substances d'épreuve de compétence.

Résultats:

— présentation sous forme de tableau des données brutes individuelles issues de chaque échantillon d'essai et de contrôle individuel pour chaque réplique;

— descriptions des autres effets observés;

— classification obtenue en lien avec le modèle prédictif/les critères de décision employés.

Discussion des résultats

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

(1) Nations Unies (UN). (2013). Système Général Harmonisé de Classification et d'Etiquetage des Produits Chimiques (SGH), cinquième édition révisée, UN New York et Genève. Disponible à l'adresse: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_f.html.

(2) Chapitre B.4 de la présente annexe, Effet irritant/corrosif aigu sur la peau.

(3) Chapitre B.40 *bis* de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: essai sur modèle de peau humaine (RHE).

(4) Chapitre B.40 de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: essai de résistance électrique transcutanée (RET).

(5) OCDE (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (N° 203). Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, 483-524.

(7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495.)

(8) Gordon V.C., Harvell J.D. and Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37-45.

▼**M8**

(9) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (N° 34).

(10) OCDE (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris. Disponible à l'adresse: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf.

(11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. ATLA 29, 96-97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Chapitre B.46 de la présente annexe, Irritation cutanée in vitro: essai sur épiderme humain reconstitué. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Disponible à l'adresse: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Disponible à l'adresse: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) Nations Unies (UN) (2013). Recommandations relatives au transport des marchandises dangereuses des Nations unies, règlements types, 18e édition révisée (Partie, Chapitre 2.8), Nations Unies, 2013. Disponible à l'adresse: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

▼**M8**

Appendice

DÉFINITIONS

Corrosion cutanée *in vivo*: survenue de lésions irréversibles de la peau. En l'occurrence, il s'agit de nécrose visible, à travers l'épiderme et jusque dans le derme, suite à l'application d'une substance d'essai pendant une durée allant jusqu'à quatre heures. Les réactions corrosives se traduisent généralement par des ulcères, des saignements, des croûtes sanguinolentes et, à la fin de la période d'observation, soit à 14 jours, par une décoloration due au blanchissement de la peau, des zones complètes d'alopécie, et des cicatrices. Un examen histopathologique peut être envisagé pour évaluer les lésions sujettes à questionnement.

Concordance: mesure de la performance des méthodes d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories. Elle constitue un des aspects de la pertinence.. Ce terme est parfois utilisé indifféremment à la place de «précision», et se définit comme la proportion de tous les produits chimiques d'essai qui ont été correctement classés comme positifs ou négatifs. La concordance dépend étroitement de la prévalence des résultats positifs dans les types de produits chimiques d'essai (9).

Fiabilité: Mesure de la reproductibilité de l'essai mis en œuvre, au sein d'un laboratoire et entre des laboratoires, au cours du temps, en utilisant le même mode opératoire. Elle est évaluée par calcul de la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires et de la répétabilité intra-laboratoire (9).

IATA: Approches Intégrées d'Essai et d'Evaluation.

Mélange: mélange ou solution composés de deux substances ou plus.

Normes de performance: Normes, basées sur un procédé d'essai validé, pour l'évaluation de la comparabilité d'un procédé d'essai proposé similaire en termes de propriétés mécanistiques et fonctionnelles. Sont inclus dans ces normes (i) les éléments essentiels de la méthode d'essai; (ii) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi les produits chimiques utilisés pour démontrer la performance correcte du procédé d'essai validé; et (iii) des niveaux de précision et de fiabilité comparables à ceux obtenus pour la méthode d'essai validée, que la méthode d'essai proposée doit présenter lorsqu'on l'évalue à l'aide des produits chimiques de référence de la liste minimale (9).

NC: non corrosif.

Pertinence: Description de la relation entre l'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité dans un objectif particulier. Elle définit le degré auquel l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'un procédé d'essai (9).

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Précision: conformité entre les résultats d'une méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de la performance de la méthode et un des aspects de sa pertinence. Le terme est souvent utilisé indifféremment avec le terme «concordance» pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (9).

▼M8

Système de détection chimique (CDS): Système de mesure visuelle ou électronique employant une solution indicatrice qui répond en présence d'un produit chimique d'essai, par exemple, par une modification d'un colorant indicateur de pH, ou d'une combinaison de ces colorants, qui change de couleur en réponse à la présence d'un produit chimique d'essai, ou par d'autres types de réactions chimiques ou électrochimiques.

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques): système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, la communication des éléments d'information correspondants, par exemple, des pictogrammes, des mentions d'avertissement, des mentions de danger, conseils de prudence et des fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans l'objectif de protéger les personnes (en particulier les employeurs, les employés, les transporteurs, les consommateurs et les personnels des services d'urgence) ainsi que l'environnement (1).

Sensibilité: Proportion des substances positives (et actives) correctement classées par l'essai. Il s'agit d'une mesure de la précision d'une méthode d'essai qui produit des résultats relatifs aux catégories, et c'est un paramètre qu'il importe prendre en considération lors de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (9).

Spécificité: Proportion des substances négatives (ou inactives) correctement classées par l'essai. Il s'agit d'une mesure de la précision d'une méthode d'essai qui produit des résultats relatifs aux catégories, et c'est un paramètre qu'il importe de prendre en considération lors de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai.

Substance: élément chimique et ses composés à l'état naturel ou obtenus par un processus de fabrication, y compris tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit et toute impureté résultant du processus mis en œuvre, à l'exclusion de tout solvant pouvant être séparé de la substance sans affecter sa stabilité ni modifier sa composition.

Substance mono-constituant: une substance, définie par sa composition quantitiative, dans laquelle un des constituants principaux est présent à hauteur d'au moins 80 % (m/m).

Substance multi-constituant: une substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant figure à une concentration supérieure ou égale à 10 % (m/m) and inférieure ou égale à 80 % (m/m). Une substance multi-constituant est le résultat d'un processus de manufacture. La différence entre un mélange et une substance multi-constituant est que le mélange est obtenu en mélangeant deux substances ou plus sans que celles-ci réagissent entre elles. Une substance multi-constituant est le résultat d'une réaction chimique.

UVCB: Substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matières biologiques.

▼M8

B.66. ESSAIS *IN VITRO* DE TRANSACTIVATION PAR TRANSFECTION STABLE VISANT LA DÉTECTION DES SUBSTANCES AGONISTES ET ANTAGONISTES DES RÉCEPTEURS DES ŒSTROGÈNES

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Ligne directrice d'essai de l'OCDE axée sur la performance

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 455 (2016) de l'OCDE. La ligne directrice 455 pour les essais de produits chimiques est axée sur la performance (LDAP) et décrit la méthodologie des essais in vitro de transactivation par transfection stable visant la détection des substances agonistes et antagonistes des récepteurs des œstrogènes (essais de TA ER). Elle comprend plusieurs essais structurellement et fonctionnellement similaires pour détecter les substances agonistes et antagonistes des récepteurs des œstrogènes (ERα et/ou ERβ), et devrait faciliter le développement de nouveaux essais similaires ou modifiés, conformément aux principes de validation exposés dans le document d'orientation de l'OCDE intitulé«Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment» (1). Les méthodes d'essai de référence totalement validées (appendices 2 et 3) qui sont à la base de la présente méthode d'essai axée sur la performance sont les suivantes:

   — Essai de TA par transfection stable (essai STTA) faisant appel à la lignée cellulaire hERα-HeLa-9903 (2); et

   — Essai de TA ER VM7Luc (3) faisant appel à la lignée cellulaire VM7Luc-4E2 ([1]) qui exprime principalement hERα, et pour partie hERβ (4) (5).

   Des normes de performance (6) (7) sont disponibles pour l'élaboration et la validation d'essais similaires visant le même danger/effet, et elles permettent de modifier la LDAP 455 en temps utile par l'ajout de nouveaux essais similaires. Toutefois, l'ajout de tels nouveaux essais similaires n'est possible qu'après examen et vérification, par l'OCDE, du respect des normes de performance. Les essais inclus dans la ligne directrice 455 peuvent être utilisés, sans discrimination, pour répondre aux exigences des pays membres de l'OCDE en matière d'essai de TA ER, dans le cadre du système d'Acceptation mutuelle de données de l'OCDE.

Contexte et principes des essais inclus dans la présente méthode d'essai

2. L'OCDE a lancé en 1998 une activité à caractère hautement prioritaire visant à réviser les lignes directrices existantes ou à établir de nouvelles lignes directrices concernant la détection et les essais de produits chimiques susceptibles

([1]) Avant juin 2016, cette lignée cellulaire était désignée lignée cellulaire BG1Luc. Les cellules BG-1 ont été décrites à l'origine par Geisinger et al. (1998) (35) et ont été ultérieurement caractérisées par les chercheurs du National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (36). Relativement récemment, on a découvert qu'il existe en fait deux variants différents des cellules BG-1 utilisées par les chercheurs, BG-1 Fr et BG-1 NIEHS. Une analyse approfondie, incluant des tests sur l'ADN, de ces deux lignées cellulaires BG-1 menée par Li et al (2014) (37) a montré que BG-1 Fr était unique et que BG-1 NIEHS, c'est à dire la lignée cellulaire d'origine utilisée pour le développement de l'essai n'était pas la lignée cellulaire d'adénocarcinome ovarien d'origine humaine, mais était en fait un variant de la lignée cellulaire MCF7 de cancer du sein d'origine humaine. La lignée cellulaire utilisée dans l'essai, citée à l'origine comme étant BG1Luc4E2 (38), est maintenant désignée VM7Luc4E2 («V» = variant; «M7» = cellules MCF7). De même, l'essai est maintenant désigné VM7Luc ER TA. Alors que cela modifie l'origine de la lignée cellulaire sur laquelle l'essai est basé, cela n'affecte pas les études de validation publiées ni l'utilité et l'application de cet essai pour la détection des produits chimiques oestrogéniques et anti-oestrogéniques.

▼M8

d'avoir des effets perturbateurs sur le système endocrinien. Le Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens (CC) a été révisé en 2012. Les versions originale et révisée de ce CC figurent en tant qu'annexes dans le document d'orientation de l'OCDE sur les lignes directrices normalisées pour évaluer l'effet perturbateur des produits chimiques sur le système endocrinien (8). Le CC comprend cinq niveaux, chacun d'entre eux correspondant à un degré différent de complexité biologique. Les essais de TA ER décrits dans la présente méthode d'essai correspondent au niveau 2, qui couvre «les essais in vitro fournissant des données sur certains mécanismes et voies d'activité endocrinienne». La présente méthode d'essai concerne les essais in vitro de transactivation (TA) conçus pour la détection des substances agonistes et antagonistes des récepteurs des œstrogènes (ER).

3. L'interaction des œstrogènes et des récepteurs des oestrogènes (ER) peut affecter la transcription des gènes régulés par les œstrogènes, ce qui est susceptible d'entraîner l'induction ou l'inhibition de processus cellulaires, notamment les mécanismes nécessaires à la prolifération cellulaire, au développement normal du fœtus et aux fonctions reproductives (9) (10) (11). La perturbation des systèmes œstrogéniques normaux pourrait déclencher des troubles du développement (ontogenèse) et nuire à la santé génésique et à l'intégrité du système reproductif.

4. Les essais *in vitro* de TA sont fondés sur une interaction directe ou indirecte entre les substances chimiques et un récepteur spécifique qui régule la transcription du produit d'un gène rapporteur. Ces essais sont largement utilisés pour évaluer l'expression génique régulée par des récepteurs nucléaires particuliers, comme les ER (12) (13) (14) (15) (16). Ils sont proposés pour détecter la transactivation œstrogénique régulée par ER (17) (18) (19). Il existe au moins deux grands sous-types de ER nucléaires, désignés α et β, qui sont encodés par des gènes distincts. Les protéines correspondantes présentent des distributions tissulaires, des affinités de liaison avec les ligands et des fonctions biologiques propres différentes (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). Les ERα nucléaires sont les médiateurs de la réponse œstrogénique classique (27) (28) (29) (30), c'est pourquoi la plupart des modèles de mesure de l'activation ou de l'inhibition des ER actuellement en cours de développement sont spécifiques aux ERα. Ces essais servent à détecter les substances chimiques qui activent (ou inhibent) les ER par la liaison du ligand au récepteur. Lecomplexe récepteur-ligand se fixe ensuite à certains éléments de réponse de l'ADN et transactive ainsi le gène rapporteur, induisant une augmentation de l'expression cellulaire d'un marqueur protéique. Ces essais s'appuient sur diverses réponses des gènes rapporteurs. Dans les systèmes faisant appel à la luciférase, l'enzyme luciférase transforme son substrat, la luciférine, en produit bioluminescent mesurable quantitativement à l'aide d'un luminomètre. Parmi les exemples de marqueurs fréquents figurent aussi une protéine fluorescente, ainsi que le gène *LacZ* qui encode la β-galactosidase, une enzyme qui transforme un substrat incolore, le X-gal (5-bromo-4-chloro-indolylgalactopyranoside) en produit bleu quantifiable au moyen d'un spectrophotomètre. Ces marqueurs peuvent être évalués rapidement et à faible coût à l'aide des nombreux kits d'essai disponibles dans le commerce.

5. Les études de validation des méthodes de STTA et de TA VM7Luc ont démontré la pertinence et la fiabilité de ces essais aux fins prévues (3) (4) (5) (30). Les normes de performance des essais de TA ER fondés sur la luminescence et utilisant des lignées cellulaires de glandes mammaires sont inclus dans le rapport d'évaluation de l'ICCVAM intitulé «ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals» (3). Ces normes ont été modifiées en vue d'être applicables aux deux essais STTA et VM7Luc (2).

6. Les définitions et abréviations utilisées dans la présente méthode d'essai sont présentées à l'appendice 1.

▼M8

Portée et limites des essais de transactivation

7. Ces essais sont proposés à des fins de criblage et de priorisation, mais ils peuvent aussi livrer des informations sur les mécanismes d'action pouvant être utilisées dans le cadre d'une approche fondée sur le poids de la preuve. Ils s'appuient sur la TA induite par l'établissement d'une liaison chimique avec les ER dans un système *in vitro*. Aussi ne convient-il pas que les résultats obtenus soient directement extrapolés aux mécanismes complexes de signalisation et de régulation qui caractérisent un système endocrinien intact *in vivo*.

8. La TA médiée par les ER est considérée comme l'un des mécanismes clés de la perturbation endocrinienne (PE), bien que d'autres processus aient les mêmes effets, notamment (i) les interactions avec d'autres récepteurs et systèmes enzymatiques du système endocrinien, (ii) la synthèse hormonale (iii) l'activation et/ou l'inactivation métaboliques des hormones, (iv) la distribution hormonale vers les tissus cibles, et (v) l'élimination des hormones de l'organisme. Aucun des essais relevant de la présente méthode d'essai ne porte sur ces modes d'action.

9. La présente méthode d'essai porte sur l'aptitude des produits chimiques à activer (activité agoniste) et aussi à inhiber (activité antagoniste) la transcription régulée par les ER. Certains produits chimiques peuvent, selon le type cellulaire utilisé, présenter à la fois une activité agoniste et antagoniste, ils sont connus sous la dénomination de modulateurs sélectifs des récepteurs des oestrogènes (MSRE). On peut envisager de soumettre les produits chimiques dont la réponse est négative dans les essais étudiés ici à un essai de liaison aux ER, avant de pouvoir conclure qu'ils ne se lient pas aux récepteurs. En outre, ces essais ne livrent qu'une indication probable de l'activité de la molécule parente, compte tenu des capacités métaboliques limitées des systèmes cellulaires *in vitro*. Étant donné que l'étude de validation n'a porté que sur des substances isolées, il n'existe aucune information quant à l'applicabilité de l'essai aux mélanges. Cette méthode d'essai est néanmoins théoriquement applicable pour tester des substances multi-constituants, des substances UVCB et des mélanges. Avant d'utiliser la méthode d'essai sur une substance multi-constituants, une substance UVCB ou un mélange en vue de générer des données à des fins réglementaires, il convient d'examiner si, et le cas échéant pourquoi, ladite méthode peut fournir des résultats adéquats aux fins visées. Ces questions ne se posent pas quand la réglementation exige de réaliser l'essai sur le mélange.

10. À titre d'information, le tableau 1 fournit les résultats de l'essai agoniste des 34 substances testées avec les deux méthodes de référence entièrement validées décrites dans la présente méthode d'essai. Parmi ces substances, 26 sont définitivement classées comme agonistes des ER et 8 comme négatives d'après les rapports publiés, notamment sur les essais *in vitro* de liaison aux ER et de TA et/ou les essais utérotrophiques (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34). Le tableau 2 fournit les résultats de l'essai antagoniste des 15 substances testées avec les deux méthodes de référence entièrement validées décrites dans la présente méthode d'essai. Parmi ces substances, 4 sont définitivement/probablement classées comme antagonistes des ER et 10 comme négatives d'après les rapports publiés, notamment sur les essais *in vitro* de liaison aux ER et de TA (2) (3) (18) (31). S'agissant des données résumées dans les tableaux 1 et 2, les deux méthodes de référence ont abouti aux mêmes conclusions pour l'ensemble des substances à l'exception de l'une d'elles (Mifepristone) pour l'essai antagoniste, et chaque substance a été classée correctement comme agoniste/antagoniste des ER ou comme négative. D'autres renseignements sur ce groupe de produits chimiques ainsi que sur les produits chimiques supplémentaires testés dans les essais de STTA et de TA ER VM7Luc dans le cadre des études de validation sont fournis dans les normes de performance pour les essais de TA ER (6) (7), appendice 2 (tableaux 1, 2 et 3).

▼M8

Tableau 1

Vue d'ensemble des résultats des essais de STTA et de TA ER VM7Luc obtenus pour les substances testées selon les deux méthodes agonistes et classées comme agonistes des ER (Pos.) ou négatifs (Nég.)

	Substance	N° CAS	Essai STTA [1]			Essai de TA ER VM7Luc [2]		Source des données pour la classification [4]		
			Activité de TA ER	TP_{10} (M)	TP_{50} [b] (M)	Activité de TA ER	TP_{10} [b], [3] (M)	TP_{50} [c] (M)		
1	17-ß-œstradiol [a]	50-28-2	Pos	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	Pos	$5{,}63 \times 10^{-12}$	Pos (227/227)	Pos	Pos
2	17-α œstradiol [a]	57-91-0	Pos	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	Pos	$1{,}40 \times 10^{-9}$	Pos(11/11)	Pos	Pos
3	17-α-éthinylestradiol [a]	57-63-6	Pos	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	Pos	$7{,}31 \times 10^{-12}$	Pos(22/22)	Pos	Pos
4	17-β-trenbolone	10161-33-8	Pos	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	Pos	$4{,}20 \times 10^{-8}$	Pos (2/2)	NT	NT
5	19-nortestostérone [a]	434-22-0	Pos	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	Pos	$1{,}80 \times 10^{-6}$	Pos(4/4)	Pos	Pos
6	4-cumylphénol [a]	599-64-4	Pos	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	Pos	$3{,}20 \times 10^{-7}$	Pos(5/5)	Pos	NT
7	4-*tert*-octylphénol [a]	140-66-9	Pos	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	Pos	$3{,}19 \times 10^{-8}$	Pos(21/24)	Pos	Pos
8	Apigénine [a]	520-36-5	Pos	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	Pos	$1{,}60 \times 10^{-6}$	Pos(26/26)	Pos	NT
9	Atrazine [a]	1912-24-9	Nég	—	—	Nég	—	Nég (30/30)	Nég	NT
10	Bisphénol A [a]	80-05-7	Pos	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	Pos	$5{,}33 \times 10^{-7}$	PoS (65/65)	Pos	Pos
11	Bisphénol B [a]	77-40-7	Pos	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	Pos	$1{,}95 \times 10^{-7}$	Pos(6/6)	Pos	Pos
12	Phtalate de butyle et de benzyle [a]	85-68-7	Pos	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	Pos	$1{,}98 \times 10^{-6}$	Pos(12/14)	Pos	Nég

▼M8

	Substance	N° CAS	Essai STTA [1]			Essai de TA ER VM7Luc [2]		Source des données pour la classification [4]		
			Activité de TA ER	TP_{10} (M)	TP_{50} [b] (M)	Activité de TA ER	TP_{10} [b], [3] (M)	TP_{50} [c] (M)		
13	Corticostérone [a]	50-22-6	Nég	—	—	Nég	—	Nég(6/6)	Nég	NT
14	Coumestrol [a]	479-13-0	Pos	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	Pos	$1{,}32 \times 10^{-7}$	Pos(30/30)	Pos	NT
15	Daidzéine [a]	486-66-8	Pos	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	Pos	$7{,}95 \times 10^{-7}$	Pos(39/39)	Pos	Pos
16	Diéthylstilbestrol [a]	56-53-1	Pos	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	Pos	$3{,}34 \times 10^{-11}$	Pos(42/42)	Pos	NT
17	Phtalate de dibutyle	84-74-2	Pos	$4{,}09 \times 10^{-6}$		Pos	$4{,}09 \times 10^{-6}$	Pos(6/11)	Pos	Nég
18	Éthylparaben	120-47-8	Pos	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(pas de TP_{50})	Pos	$2{,}48 \times 10^{-5}$	Pos		NT
19	Œstrone [a]	53-16-7	Pos	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	Pos	$2{,}34 \times 10^{-10}$	Pos(26/28)	Pos	Pos
20	Génistéine [a]	446-72-0	Pos	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	Pos	$2{,}71 \times 10^{-7}$	Pos(100/102)	Pos	Pos
21	Halopéridol	52-86-8	Nég	—	—	Nég	—	Nég (2/2)	Nég	NT
22	Kaempférol [a]	520-18-3	Pos	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	Pos	$3{,}99 \times 10^{-6}$	Pos(23/23)	Pos	NT
23	Képone [a]	143-50-0	Pos	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	Pos	$4{,}91 \times 10^{-7}$	Pos(14/18)	Pos	NT
24	Kétoconazole	65277-42-1	Nég	—	—	Nég	—	Nég (2/2)	Nég	NT
25	Linuron [a]	330-55-2	Nég	—	—	Nég	—	Nég (8/8)	Nég	NT
26	*méso*-hexestrol [a]	84-16-2	Pos	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	Pos	$1{,}65 \times 10^{-11}$	Pos(4/4)	Pos	NT
27	Méthyltestostérone [a]	58-18-4	Pos	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	Pos	$2{,}68 \times 10^{-6}$	Pos(5/6)	Pos	NT

▼M8

	Substance	N° CAS	Essai STTA [1]			Essai de TA ER VM7Luc [2]		Source des données pour la classification [4]		
			Activité de TA ER	TP_{10} (M)	TP_{50} [b] (M)	Activité de TA ER	TP_{10} [b], [3] (M)	TP_{50} [c] (M)		
28	Morine	480-16-0	Pos	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	Pos	$2{,}37 \times 10^{-6}$	Pos(2/2)	Pos	NT
29	Noréthynodrel [a]	68-23-5	Pos	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	Pos	$9{,}39 \times 10^{-10}$	Pos(5/5)	Pos	NT
30	*p,p*'-méthoxychlore [a]	72-43-5	Pos	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(pas de TP_{50})b	Pos	$1{,}92 \times 10^{-6}$	Pos(24/27)	Pos	Pos
31	Phénobarbital [a]	57-30-7	Nég	—	—	Nég	—	Nég(2/2)	Nég	NT
32	Réserpine	50-55-5	Nég	—	—	Nég	—	Nég(4/4)	Nég	NT
33	Spironolactone [a]	52-01-7	Nég	—	—	Nég	—	Nég(4/4)	Nég	NT
34	Testostérone	58-22-0	Pos	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	Pos	$1{,}75 \times 10^{-5}$	Pos(5/10)	Pos	NT

Abréviations: N° CAS = Numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service; M = molaire; CE_{50} = concentration efficace de la substance d'essai induisant une réponse égale à la moitié de la réponse maximale; Nég. = négative; Pos. = positive; NT: non testé; TP_{10} (et TP_{50}) = concentration de la substance d'essai pour laquelle l'activité est égale à 10 % (ou 50 % pour la TP_{50}) de l'activité maximale induite par le témoin positif (E2 à 1 nm), dans chaque plaque.

([a]) Substances courantes soumises aux essais STTA et de TA ER VM7Luc et classées comme agonistes des ER ou négatives, utilisées pour évaluer la précision lors de l'étude de validation de l'essai de TA ER VM7Luc (ICCVAM VM7Luc ER TA Evaluation Report, tableau 4-1 [3]).

([b]) La concentration d'essai maximale en l'absence de limites dues à la cytotoxicité ou la solubilité s'élevait respectivement à 1×10^{-5} M (STTA) et 1×10^{-3} M (TA ER VM7Luc).

([c]) Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résultats positifs (Pos.) ou négatifs (Nég.) par rapport au nombre total d'études de référence.

([1]) Valeurs rapportées dans le document Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line (2)

([2]) ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3)

([3]) CE_{50} moyennes calculées à partir des valeurs rapportées par les laboratoires impliqués dans l'étude de validation de la méthode de TA ER VM7Luc (XDS, ECVAM et Hiyoshi) (3).

([4]) Les substances sont classées comme agonistes des ER ou négatives d'après les informations des Background Review Documents (BRD) de l'ICCVAM relatifs aux essais de liaison aux ER et de TA ER (31) et les données tirées des publications parues et examinées à la suite des BRD de l'ICCVAM (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Notes: Les essais inclus dans la présente méthode d'essai n'utilisent pas tous les mêmes paramètres de mesure. Dans certains cas, la CE_{50} ne peut pas être calculée car une courbe dose-réponse complète ne peut pas être générée. Alors qu'avec la méthode d'essai STTA, la valeur de TP_{10} est un paramètre de mesure clé, il peut y avoir d'autres exemples où une TP_x donnera des informations utiles.

▼M8

Tableau 2

Comparaison des résultats des essais de STTA et de TA ER VM7Luc obtenus pour les substances testées selon les deux méthodes antagonistes et classées comme antagonistes des ER (Pos.) ou négatifs (Neg.)

	Substance [a]	N° CAS	Essai ER STTA [1]		Essai de TA ER VM7Luc [2]		ER STTA réponses attendues [4]	ICCVAM [5] Consensus de classification	Classe chimique dans le système MeSH [6]	Type de produit [7]
			Activité de TA ER	CI_{50} [b] (M)	Activité de TA ER	CI_{50} [b], [3] (M)				
1	4-hydroxytamoxifène	68047-06-3	Pos.	$3{,}97 \times 10^{-9}$	Pos.	$2{,}08 \times 10^{-7}$	Pos. modéré	Pos.	Hydrocarbure (Cyclique)	Produit pharmaceutique
2	Dibenzo[a.h] anthracène	53-70-3	Pos.	No IC_{50}	Pos.	No IC_{50}	Pos.	PP	Composé polycyclique	Produit chimique de laboratoire, produit naturel
3	Mifépristone	84371-65-3	Pos.	$5{,}61 \times 10^{-6}$	Nég.	—	faiblement Pos.	Nég.	Stéroïde	Produit pharmaceutique
4	Raloxifène HCl	82640-04-8	Pos.	$7{,}86 \times 10^{-10}$	Pos.	$1{,}19 \times 10^{-9}$	Pos. modéré	Pos.	Hydrocarbure (Cyclique)	Produit pharmaceutique
5	Tamoxifène	10540-29-1	Pos.	$4{,}91 \times 10^{-7}$	Pos.	$8{,}17 \times 10^{-7}$	Pos.	Pos.	Hydrocarbure (Cyclique)	Produit pharmaceutique
6	17-ß-œstradiol	50-28-2	Nég.	—	Nég.	—	PN	PN	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire

▼M8

	Substance [a]	N° CAS	Essai ER STTA [1]		Essai de TA ER VM7Luc [2]		ER STTA réponses attendues [4]	ICCVAM [5] Consensus de classification	Classe chimique dans le système MeSH [6]	Type de produit [7]
			Activité de TA ER	CI_{50} [b] (M)	Activité de TA ER	CI_{50} [b], [3] (M)				
7	Apigénine	520-36-5	Nég.	—	Nég.	—	Nég.	Nég.	Composé hétérocyclique	Colorant, produit naturel, intermédiaire de synthèse pharmaceutique
8	Atrazine	1912-24-9	Nég.	—	Nég.	—	Nég.	PN	Composé hétérocyclique	Herbicide
9	Di-n-butyl phtalate	84-74-2	Nég.	—	Nég.	—	Nég.	Nég.	Ester, Acide phtalique	Ingrédient cosmétique, produit chimique industriel, plastifiant
10	Fénarimol	60168-88-9	Nég.	—	Nég.	—	Non testé	PN	Composé hétérocyclique, Pyrimidine	Fongicide
11	Flavone	525-82-6	Nég.	—	Nég.	—	PN	PN	Flavonoïde, Composé hétérocyclique	Produit naturel, produit pharmaceutique
12	Flutamide	13311-84-7	Nég.	—	Nég.	—	Nég.	PN	Amide	Produit pharmaceutique et vétérinaire
13	Génistéine	446-72-0	Nég.	—	Nég.	—	PN	Nég.	Flavonoïde, Composé hétérocyclique	Produit naturel, produit pharmaceutique

▼M8

	Substance ([a])	N° CAS	Essai ER STTA ([1])		Essai de TA ER VM7Luc ([2])		ER STTA réponses attendues ([4])	ICCVAM ([5]) Consensus de classification	Classe chimique dans le système MeSH ([6])	Type de produit ([7])
			Activité de TA ER	CI_{50} ([b]) (M)	Activité de TA ER	CI_{50} ([b]), ([3]) (M)				
14	p-n-nonylphenol	104-40-5	Nég.	—	Nég.	—	Non testé	Nég.	Phénol	Intermédiaire chimique
15	Resvératrol	501-36-0	Nég.	—	Nég.	—	PN	Nég.	Hydrocarbure (Cyclique)	Produit naturel

Abréviations: N° CAS = Numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service; M = molaire; CI_{50} = concentration induisant la moitié de l'inhibition maximale; Nég. = négative; PN = présumée négative; Pos. = positive; PP = présumée positive.

([a]) Substances courantes soumises aux essais STTA et de TA ER VM7Luc et classées comme antagonistes des ER ou négatives, utilisées pour évaluer la précision lors de l'étude de validation de l'essai de TA ER VM7Luc (2) (3).

([b]) La concentration d'essai maximale en l'absence de limites dues à la cytotoxicité ou la solubilité s'élevait respectivement à 1×10^{-3} M (STTA) et 1×10^{-5} M (TA ER VM7Luc).

([1]) Valeurs rapportées dans le document Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Partie B (2)

([2]) ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

([3]) CI_{50} moyennes calculées à partir des valeurs rapportées par les laboratoires impliqués dans l'étude de validation de la méthode de TA ER VM7Luc (XDS, ECVAM et Hiyoshi) (3).

([4]) Activité TA ER attendue, sur la base des effets connus reportés à partir de la base de données historiques du CERI pour l'essai de liaison aux ER, de l'essai utérotrophique et des informations collectées dans la littérature (2)

([5]) Les substances sont classées comme antagonistes des ER ou négatives d'après les informations des Background Review Documents (BRD) de l'ICCVAM relatifs aux essais de liaison aux ER et de TA ER (31) et les données tirées des publications parues et examinées à la suite des BRD de l'ICCVAM(2) (3) (18) (31).

([6]) Les substances ont été placées dans une ou plusieurs classes de produits chimiques selon le système de classification du Medical Subject Headings (MeSH) de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis, norme reconnue internationalement (disponible à l'adresse: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Les substances ont été placées dans un ou plusieurs types de produits selon la base de données Hazardous Substances Database de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis (disponible à l'adresse: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB

▼M8

ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE TA ER

Éléments essentiels de l'essai

11. La présente méthode d'essai s'applique aux essais faisant appel à un ERα transfecté de façon stable ou endogène, et une chimère de gène rapporteur transfectée de façon stable et régulée par un ou plusieurs éléments de réponse aux œstrogènes; d'autres récepteurs, comme ERβ, peuvent toutefois être présents. Ces éléments constituent l'essence des essais visés.

Témoins

12. Les raisons qui ont amené à proposer les étalons de référence pour l'essai agoniste et antagoniste sont décrites. Les témoins simultanément inclus dans l'essai (négatif, solvant et positif) selon le cas servent à indiquer que l'essai fonctionne dans les conditions expérimentales, et permettent de comparer les expériences. Ainsi, pour une expérience donnée, les témoins sont généralement pris en compte dans les critères d'acceptabilité (1).

Procédures standard de contrôle de qualité

13. Il convient de suivre les procédures standard de contrôle de qualité décrites pour chaque essai afin de garantir que la lignée cellulaire reste stable au cours des multiples passages, demeure exempte de mycoplasmes (c'est-à-dire exempte de contamination bactérienne), et conserve sa capacité à fournir les réponses médiées par les ER attendues au fil du temps. Par ailleurs, l'identité exacte des lignées cellulaires est vérifiée, ainsi que la présence d'autres contaminants (p. ex. moisissures, levures et virus).

Démonstration de la compétence du laboratoire

14. Avant de tester des produits chimiques inconnus par l'un des essais relevant de la présente méthode d'essai, il convient que chaque laboratoire démontre sa capacité à mettre en œuvre l'essai. Pour démontrer cette capacité, il convient que chaque laboratoire teste les 14 substances d'épreuve de compétence indiquées dans le tableau 3 pour l'essai agoniste et les 10 substances d'épreuve de compétence indiquées dans le tableau 4 pour l'essai antagoniste. Cette démonstration de la compétence permet également de confirmer la réactivité du système d'essai. La liste des substances d'épreuve de compétence constitue une sous-catégorie des substances de référence indiquées dans les normes de performance des essais de TA ER (6). Ces substances sont disponibles dans le commerce, représentent les classes de produits chimiques communément associées à une activité œstrogénique agoniste ou antagoniste, manifestent une gamme d'activité correspondant aux puissances attendues pour l'effet agoniste ou antagoniste des ER (de faible à forte), et incluent des substances négatives. Ces substances d'épreuve de compétence sont testées au moins deux fois, à des jours différents. La compétence est démontrée lorsque chaque substance d'épreuve de compétence est correctement classée (réponse positive/négative). L'épreuve de compétence est répétée par chaque technicien dans le cadre de la formation aux essais. Selon le type cellulaire, certaines de ces substances d'épreuve peuvent se comporter comme des MSRE et présenter à la fois une activité agoniste et antagoniste. Cependant, dans les tableaux 3 et 4, les substances d'épreuve sont classées par leur activité connue pour être prépondérante; c'est celle qui sera utilisée pour l'évaluation de la capacité à mettre en œuvre la méthode d'essai.

15. Pour démontrer la performance et dans un but de contrôle de la qualité, il convient que chaque laboratoire établisse des bases de données agonistes et antagonistes avec les données des étalons de référence (par exemple le 17β-estradiol et le tamoxifène), des substances témoins positives et négatives et du solvant témoin (par exemple DMSO). Au début, la base de données est générée à partir d'au moins 10 épreuves agonistes indépendantes (par exemple 17β-estradiol) et 10 épreuves antagonistes indépendantes (par exemple tamoxifène). Il convient d'ajouter les résultats de l'analyse ultérieure de ces étalons de référence et témoin solvant pour élargir la base de données et permettre de s'assurer de la compétence et de la performance du bio-essai par le laboratoire au cours du temps.

▼M8

Tableau 3

Liste des (14) substances d'épreuve de compétence pour l'essai agoniste [1]

N° [8]	Substance	N° CAS	Réponse attendue [2]	Essai STTA			Essai de TA ER VM7Luc		Classe chimique dans le système MeSH [6]	Type de produit [7]
				TP_{10} (M) [3]	TP_{50} (M) [3]	Fourchette de concentrations de l'essai (M)	CE_{50} pour VM7Luc (M) [4]	Concen-tration maximale pour l'essai préliminaire (M) [5]		
14	Diéthylstilbestrol	56-53-1	Pos.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} – 10^{-8}$	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Hydrocarbure (cyclique)	Produit pharmaceutique et vétérinaire
12	17STARTSYMBOL-FONTF0B5ENDSYMBOL-FONT-œstradiol	57-91-0	Pos.	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
15	*méso*-hexestrol	84-16-2	Pos.	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Hydrocarbure (cyclique), phénol	Produit pharmaceutique et vétérinaire
11	4-*tert*-octylphénol	140-66-9	Pos.	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Phénol	Intermédiaire chimique
9	Génistéine	446-72-0	Pos.	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Flavonoïde, composé hétérocyclique	Produit naturel et pharmaceutique
6	Bisphénol A	80-05-7	Pos.	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Phénol	Intermédiaire chimique

▼M8

N° (8)	Substance	N° CAS	Réponse attendue (2)	Essai STTA			Essai de TA ER VM7Luc		Classe chimique dans le système MeSH (6)	Type de produit (7)
				TP_{10} (M) (3)	TP_{50} (M) (3)	Fourchette de concentrations de l'essai (M)	CE_{50} pour VM7Luc (M) (4)	Concen-tration maximale pour l'essai préliminaire (M) (5)		
2	Kaempférol	520-18-3	Pos.	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flavonoïde, composé hétéro-cyclique	Produit naturel
3	Phtalate de butyle et de benzyle	85-68-7	Pos.	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Acide carboxy-lique, ester, acide phtalique	Plastifiant, produit chimique industriel
4	*p,p*'-méthoxychlore	72-43-5	Pos.	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Hydrocarbure (halogéné)	Pesticide, produit vétérinaire
1	Éthylparaben	120-47-8	Pos.	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Acide carboxy-lique, phénol	Produit pharma-ceutique, conser-vateur
17	Atrazine	1912-24-9	Nég.	—	—	$10^{-10} – 10^{-4}$	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Composé hétéro-cyclique	Herbicide
20	Spironolactone	52-01-7	Nég.	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Lactone, stéroïde	Produit pharma-ceutique
21	Kétoconazole	65277-42-1	Nég.	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Composé hétéro-cyclique	Produit pharma-ceutique

▼M8

N° (8)	Substance	N° CAS	Réponse attendue (2)	Essai STTA			Essai de TA ER VM7Luc		Classe chimique dans le système MeSH (6)	Type de produit (7)
				TP_{10} (M) (3)	TP_{50} (M) (3)	Fourchette de concentrations de l'essai (M)	CE_{50} pour VM7Luc (M) (4)	Concen-tration maximale pour l'essai prélimi-naire (M) (5)		
22	Réserpine	50-55-5	Nég.	—	—	10^{-11} – 10^{-5}	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Composé hétéro-cyclique, indole	Produit pharma-ceutique et vété-rinaire

Abbreviations: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number; EC_{50} = half maximal effective concentration of test substance; NÉG = Négative; POS = Positive; PC_{10} (and PC_{50}) = the concentration of a test substance at which the response is 10 % (or 50 % for PC_{50}) of the response induced by the Positive control (E2, 1nM) in each plate.

(1) Les substances sont classées comme positives ou négatives pour l'effet agoniste des ER d'après les informations des Background Review Documents (BRD) de l'ICCVAM relatifs aux essais de liaison aux ER et de TA ER (31), ainsi que des données empiriques et d'autres données tirées des publications parues et examinées à la suite des BRD de l'ICCVAM (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

(2) Valeurs rapportées dans le document Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line (30).

(3) CE_{50} moyennes calculées à partir des valeurs rapportées par les laboratoires impliqués dans l'étude de validation de la méthode de TA ER VM7Luc (XDS, ECVAM et Hiyoshi) (3).

(4) Les concentrations indiquées correspondent aux concentrations maximales testées (essai préliminaire) lors de la validation de l'essai de TA ER VM7Luc. Quand les laboratoires impliqués ont employé des concentrations différentes, c'est la concentration maximale qui est indiquée dans le tableau. Voir le tableau 4-10 du document ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3).

(5) Les substances ont été placées dans une ou plusieurs classes de produits chimiques selon le système de classification du Medical Subject Headings (MeSH) de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis, norme reconnue internationalement (disponible à l'adresse: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

(6) Les substances ont été placées dans un ou plusieurs types de produits selon la base de données Hazardous Substances Database de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis (disponible à l'adresse: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB

(7) D'après le tableau 1 (List of Reference Chemicals (22) for Evaluation of ER Agonist Accuracy) des normes de performance (6).

(8) Si une substance d'épreuve de compétence n'est plus commercialement disponible, une substance ayant la même classification, et une puissance, un mode d'action et une classe chimique comparables, peut être utilisée.

▼M8

Tableau 4

Liste des (10) substances d'épreuve de compétence pour l'essai antagoniste

	Substance [a]	N° CAS	Essai ER STTA [1]			Essai de TA ER VM7Luc [2]			ER STTA [1] réponses attendues	ICCVAM [5] Consensus de classification	Classe chimique dans le système MeSH [6]	Type de produit [7]
			Activité de TA ER	CI_{50} (M)	Fourchette de concentrations de l'essai (M)	Activité de TA ER	CI_{50} [3] (M)	Concen-tration maximale pour l'essai préliminaire (M) [4]				
1	4-hydroxyta-moxifène	68047-06-3	Pos.	$3{,}97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	Pos.	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	Pos. modéré	Pos.	Hydrocarbure (cyclique)	Produit pharmaceutique
2	Raloxifène HCl	82640-04-8	Pos.	$7{,}86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	Pos.	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	Pos. modéré	Pos.	Hydrocarbure (cyclique)	Produit pharmaceutique
3	Tamoxifène	10540-29-1	Pos.	$4{,}91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} – 10^{-5}$	Pos.	$8{,}17 \times 10^{-7}$	$2{,}69 \times 10^{-4}$	Pos.	Pos.	Hydrocarbure (cyclique)	Produit pharmaceutique
4	17β-estradiol	50-28-2	Nég.	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	Nég.	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Nég. (*)	PN	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
5	Apigénine	520-36-5	Nég.	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	Nég.	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Nég.	Nég.	Composé hétérocy-clique	Colorant, produit naturel, intermédiaire de synthèse pharmaceutique
6	Di-n-butyl phta-late	84-74-2	Nég.	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	Nég.	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	Nég.	Nég.	Ester, acide phta-lique	Ingrédient cosmétique, produit chimique industriel, plastifiant

▼M8

	Substance ([a])	N° CAS	Essai ER STTA ([1])			Essai de TA ER VM7Luc ([2])			ER STTA ([1]) réponses attendues	ICCVAM ([5]) Consensus de classification	Classe chimique dans le système MeSH ([6])	Type de produit ([7])
			Activité de TA ER	CI_{50} (M)	Fourchette de concentrations de l'essai (M)	Activité de TA ER	CI_{50} ([3]) (M)	Concen-tration maximale pour l'essai préliminaire (M) ([4])				
7	Flavone	525-82-6	Nég.	—	10^{-8} – 10^{-3}	Nég.	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	Nég. (*)	PN	Flavonoïde, composé hétérocyclique	Produit naturel, produit pharmaceutique
8	Génistéine	446-72-0	Nég.	—	10^{-9} – 10^{-4}	Nég.	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Nég. (*)	Nég.	Flavonoïde, composé hétérocyclique	Produit naturel, produit pharmaceutique
9	p-n-nonylphénol	104-40-5	Nég.	—	10^{-9} – 10^{-4}	Nég.	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	non testé	Nég.	Phénol	Intermédiaire chimique
10	Resvératrol	501-36-0	Nég.	—	10^{-8} – 10^{-3}	Nég.	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	Nég. (*)	Nég.	Hydrocarbure (cyclique)	Produit naturel

Abréviations: N° CAS = Numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service; M = molaire; CI_{50} = concentration induisant la moitié de l'inhibition maximale; Nég. = négative; Nég
(*) = classée négative sur la base de la revue de la littérature (31); PN = présumée négative; Pos. = positive;

([a]) Substances courantes soumises aux essais STTA et de TA ER VM7Luc et classées comme antagonistes des ER ou négatives, utilisées pour évaluer la précision lors de l'étude de validation de l'essai de TA ER VM7Luc (2) (3).

([1]) Valeurs rapportées dans le document Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Partie B (2)

([2]) ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

([3]) Mean IC_{50} values were calculated with values reported by the laboratories of the VM7Luc ER TA validation study (XDS, ECVAM, and Hiyoshi) (3).

([4]) Les concentrations indiquées correspondent aux concentrations maximales testées (essai préliminaire) lors de la validation de l'essai de TA ER VM7Luc. Quand les laboratoires impliqués ont employé des concentrations différentes, c'est la concentration maximale qui est indiquée dans le tableau. Voir le tableau 4-11 du document ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3).

([5]) Les substances sont classées comme antagonistes des ER ou négatives d'après les informations des Background Review Documents (BRD) de l'ICCVAM relatifs aux essais de liaison aux ER et de TA ER (31) et les données tirées des publications parues et examinées à la suite des BRD de l'ICCVAM (2) (3) (18) (31).

([6]) Les substances ont été placées dans une ou plusieurs classes de produits chimiques selon le système de classification du Medical Subject Headings (MeSH) de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis, norme reconnue internationalement (disponible à l'adresse: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Les substances ont été placées dans un ou plusieurs types de produits selon la base de données Hazardous Substances Database de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis (disponible à l'adresse: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB

▼M8

Critères d'acceptabilité de l'épreuve

16. L'acceptation ou le rejet d'une épreuve dépend de l'évaluation des résultats obtenus avec les étalons de de référence et les témoins utilisés pour chaque expérience. Il convient que les TP_{50} (CE_{50}) ou les CI_{50} des étalons de référence respectent les critères d'acceptabilité de l'essai choisi (pour l'essai de STTA voir l'appendice 2, pour l'essai de TA ER VM7Luc voir l'appendice 3), et que tous les témoins positifs et négatifs soient classés correctement par les expérimentations acceptées. Un laboratoire prouve sa compétence à répéter un essai de manière homogène en établissant et entretenant une base de données compilant les résultats historiques pour les étalons de référence et les témoins (voir paragraphe 15). Les écarts-types (ET) ou coefficients de variation (CV) des moyennes des paramètres d'ajustement des courbes de réponse des étalons de référence obtenus après plusieurs expériences peuvent servir à mesurer la reproductibilité intra-laboratoire. De plus, on respectera les principes suivants eu égard aux critères d'acceptabilité:

— Il convient que les données soient suffisantes pour évaluer quantitativement l'activation des ER (pour l'essai agoniste) ou leur inhibition (pour l'essai antagoniste) (c'est-à-dire efficacité et puissance).

— L'activité moyenne du marqueur obtenue avec la concentration de référence de la substance œstrogénique de référence est supérieure ou égale à la réponse minimale préconisée dans les essais, par rapport à la réponse du véhicule (solvant) témoin, afin de garantir une sensibilité adéquate. S'agissant des essais de STTA et de TA ER VM7Luc, ce minimum correspond à quatre fois la réponse moyenne du véhicule témoin pour chaque plaque.

— Les concentrations testées restent inférieures à la limite de solubilité des produits chimiques d'essai et ne sont pas cytotoxiques.

Analyse des données

17. Pour déterminer si une réponse est positive ou négative, on s'appuiera sur la procédure d'interprétation des données établie pour chaque essai.

18. Le respect des critères d'acceptabilité (paragraphe 16) indique que l'essai fonctionne correctement, mais ne garantit pas que chaque épreuve lancée fournira des données exactes. La réplication des résultats de la première épreuve constitue la meilleure indication que les valeurs obtenues sont exactes. Si deux épreuves donnent des résultats reproductibles (par ex. si elles concluent toutes les deux que le produit chimique d'essai est positif), il n'est pas nécessaire d'en réaliser une troisième.

19. Si deux épreuves ne donnent pas de résultats reproductibles (par ex. produit chimique d'essai positif selon l'une et négatif selon l'autre), ou si un degré de certitude supérieur est requis pour pouvoir conclure, il convient de mener au moins trois épreuves indépendantes. Dans ce cas, la classification est basée sur les deux résultats concordants sur les trois épreuves menées.

Critères généraux d'interprétation des données

20. Il n'existe actuellement aucune méthode d'interprétation des données d'essai de TA ER universellement reconnue. Cependant, il convient que les évaluations qualitatives (par ex. activité positive ou négative) et/ou quantitatives (par ex. CE_{50}, TP_{50}, CI_{50}) de l'activité médiée par les ER s'appuient sur des données empiriques et des raisonnements scientifiques solides. Dans la mesure du possible, les résultats positifs seront caractérisés à la fois par l'amplitude de l'effet induit par rapport à la réponse du véhicule (solvant) témoin ou la substance œstrogénique de référence, et par la concentration correspondant à cet effet (par ex. CE_{50}, TP_{50}, RTP_{Max}, CI_{50} etc.).

▼**M8**

Rapport d'essai

21. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Essai:

— essai employé;

— témoins/étalons de référence/produit chimique d'essai;

— source, numéro de lot, date limite d'utilisation, si disponible;

— stabilité du produit chimique d'essai lui-même, si elle est connue;

— solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant, si elles sont connues;

— mesures du pH, de l'osmolalité et du précipité apparu dans le milieu auquel le produit chimique d'essai est ajouté, le cas échéant.

Substance mono-constituant:

— apparence physique, solubilité dans l'eau et autres propriétés physicochimiques pertinentes;

— données d'identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges:

— caractérisée, autant que possible par p.ex. l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence quantitative et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants.

Solvent/Vehicle:

— caractérisation (nature, fournisseur et lot);

— justification du choix du solvant/véhicule;

— solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant/véhicule, le cas échéant.

Cellules:

— type et source des cellules:

  • ER est-il exprimé de façon endogène? Dans le cas contraire, quel(s) récepteur(s) a/ont été transfecté(s);

  • chimère(s) de gènes rapporteurs utilisée(s) (y compris les espèces d'origine);

  • méthode de transfection;

  • méthode de sélection employée pour maintenir une transfection stable (le cas échéant);

  • la méthode de transfection permet-elle d'obtenir des lignées stables?

— nombre de passages des cellules après leur décongélation;

▼**M8**

— nombre de passages des cellules au moment de leur décongélation;

— méthodes d'entretien des cultures cellulaires.

Conditions d'essai:

— limites de solubilité;

— description des méthodes d'évaluation de la viabilité employées;

— composition du milieu, concentration de CO_2;

— concentrations du produit chimique d'essai;

— volume de véhicule et du produit chimique d'essai ajouté;

— température d'incubation et humidité;

— durée du traitement;

— densité cellulaire au début et au cours du traitement;

— standards de référence positif et négatif;

— réactifs marqueurs (nom du produit, fournisseur, lot);

— critères d'interprétation des résultats positif, négatif ou équivoque.

Vérification de l'acceptabilité:

— multiplication de l'induction dans chaque plaque d'essai et comparaison par rapport au minimum requis pour l'essai concerné eu égard aux données historiques des témoins;

— valeurs réelles des $logCE_{50}$, $logTP_{50}$, $logIC_{50}$ et pente de Hill pour les témoins positifs et étalons de référence simultanément inclus dans l'essai.

Résultats:

— données brutes et normalisées;

— niveau d'induction maximum;

— données relatives à la cytotoxicité;

— concentration minimale avec effet (CME), le cas échéant;

— RTP_{Max}, TP_{Max}, TP_{50}, IC_{50} et/ou CE_{50}, s'il y a lieu;

— relation concentration-réponse, si possible;

▼M8

— analyses statistiques, le cas échéant, ainsi qu'une mesure de l'erreur et de la confiance (par exemple erreur-type de la moyenne, écart-type, CV ou IC 95 %) et description de la façon dont ces données ont été obtenues.

Discussion des résultats

Conclusion

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 34.), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(2) OCDE (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), de coopération et de développement économiques, Paris.

(3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vit*ro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(4) Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): p. 5367-73.

(5) Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 13(1): p. 67-82.

(6) OCDE (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 173.), de coopération et de développement économiques, Paris.

(7) OCDE (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 174.), Organisationde coopération et de développement économiques, Paris.

(8) OCDE (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150.), Organisationde coopération et de développement économiques, Paris.

(9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: p. 20- 6.

(10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): p. 1073-89.

(11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): p. 63- 6.

▼**M8**

(12) Jefferson W.N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, Journal of Chromatography B, 777(1-2): p. 179-189.

(13) Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of I*n Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol*. Sci., 89(1): p. 173-187.

(14) Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): p. 91- 98.

(15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, ATLA Alternatives to Laboratory Animals,28(1): p. 81-118.

(16) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol,71(10): p. 1459-69.

(17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol*. Lett, 102-103, 677-680.

(18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

(19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor ß - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, Journal of Endocrinology, 163(3): p. 379-383.

(21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα *In Vivo* and *In Vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): p. 122-126.

(22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,82(12): p. 4258-4265.

(23) Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): p. 204-211.

(24) Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): p. 105-12.

(25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): p. 1703-1714.

(26) Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): p. 558-568.

(27) Anderson J.N. Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): p. 1460-1468.

▼**M8**

(28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): p. 515-522.

(29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: p. 45-80.

(30) Jensen E.V. *et al.* (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3):p. 547-569.

(31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (N° 03-4505.).

(32) Kanno J. *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785-94.

(33) Kanno J. *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549.

(34) Kanno J. *et al.* (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

(35) Geisinger *et al.* (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(36) Baldwin *et al.* (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(37) Li, Y. *et al.* (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(38) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

▼**M8**

Appendice 1

DÉFINITIONS AND ABRÉVIATIONS

Activité anti-œstrogénique: capacité d'un produit chimique à inhiber l'action du 17β-œstradiol médiée par le récepteur d'œstrogène.

Activité œstrogénique: capacité d'un produit chimique à reproduire la capacité du 17β-œstradiol à se fixer aux récepteurs d'œstrogène et à les activer. L'activité œstrogénique médiée par hERα peut être détectée en appliquant la présente méthode d'essai.

Agoniste: substance qui provoque une réponse, par exemple une transcription, lorsqu'elle se lie à un récepteur spécifique.

Antagoniste: type de ligand d'un récepteur ou type de produit chimique qui ne provoque pas en soi de réponse biologique mais bloque ou atténue la réponse due aux agonistes

ARN: acide ribonucléique.

CC: Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens.

CE_{50}: concentration efficace du produit chimique d'essai induisant la moitié de la réponse maximale

CI_{50}: concentration efficace du produit chimique d'essai induisant la moitié de l'inhibition maximale

CME (Concentration minimale avec effet): concentration la plus faible du produit chimique d'essai induisant une réponse (soit la concentration la plus faible du produit chimique d'essai pour laquelle l'augmentation de l'induction est statistiquement différente de celle du véhicule témoin concurrent)

Critères d'acceptabilité: normes minimales concernant la performance des témoins et étalons de référence de l'essai. Pour qu'un essai soit jugé valide, tous les critères d'acceptabilité doivent être respectés.

Compétence: capacité à conduire correctement un essai, démontrée avant de tester des substances inconnues

CV: Coefficient de variation

Cytotoxicité: effets dommageables sur la structure ou les fonctions de la cellule pouvant entraîner in fine la mort cellulaire et traduits éventuellement par une réduction du nombre de cellules présentes dans le puits à la fin de la phase d'exposition ou par une réduction de la capacité à mesurer une fonction cellulaire en comparaison avec le véhicule témoin concurrent.

DCC-FBS: Dextran-coated charcoal treated fetal bovine serum (sérum bovin fœtal traité au charbon enrobé de dextrane)

DMEM: Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (milieu de Eagle modifié de Dulbecco)

DMSO: diméthylsulfoxyde

E2: 17β-estradiol

Épreuve: expérimentation particulière qui évalue l'action d'un produit chimique sur l'aspect biologique de l'essai. Chaque épreuve est une expérimentation complète réalisée sur des puits en réplicat, en même temps et avec des cellules qui proviennent de la même réserve de cellules.

▼**M8**

Épreuve indépendante: expérimentation isolée indépendante, qui évalue l'action d'un produit chimique sur l'aspect biologique de l'essai, utilisant des cellules qui proviennent de réserves de cellules différentes, des produits chimiques fraichement dilués, et réalisée soit à des jours différents soit le même jour mais par un opérateur différent.

Étude: La gamme complète du travail expérimental réalisé pour évaluer une substance unique spécifique, au moyen d'un essai spécifique. Une étude comprend toutes les étapes incluant les essais de dilution de la substance d'essai dans le milieu d'essai, les épreuves préliminaires de détermination des concentrations, toutes les épreuves complètes nécessaires, les analyses de données, l'assurance qualité, l'évaluation de la cytotoxicité, etc. La réalisation d'une étude permet la classification de l'activité du produit chimique d'essai vis-à-vis du type de toxicité évalué par l'essai (i.e. active, inactive ou non concluant) et permet de caractériser la réponse par rapport à l'étalon de référence positif.

ER: Estrogen Receptor (récepteur des œstrogènes)

ERE: Estrogen Response Element (élément de réponse aux œstrogènes)

Essai: dans le contexte de la présente méthode d'essai, un essai est une des méthodologies acceptées comme valide puisqu'elle remplit les critères de performance décrits. Les éléments de l'essai incluent, par exemple, une lignée cellulaire spécifique avec des conditions de croissance associées, un milieu spécifique dans lequel est conduit l'essai, les conditions de préparation des plaques, la disposition et la dilution des produits chimiques d'essai, et toute autre mesure obligatoire de contrôle de la qualité ainsi que les étapes d'évaluation de données qui y sont associées.

Essai STTA: *Stably Transfected Transactivation Assay*, se dit de l'essai de transactivation des ERα fondé sur la lignée cellulaire HeLa 9903

ET: écart-type

Étalon de référence: substance de référence utilisée pour démontrer l'adéquation d'un essai. Pour les essais de TA ER STTA et VM7Luc, il s'agit du 17β-œstradiol.

FBS: Fetal Bovine Serum (sérum bovin fœtal)

Fiabilité: mesure dans laquelle la mise en œuvre d'un essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée par calcul de la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires.

HeLa: lignée de cellules de col utérin immortalisées d'origine humaine

HeLa9903: sous-clone de la lignée cellulaire HeLa transfecté de façon stable avec un hERα et un gène rapporteur de la luciférase

hERα: récepteur des œstrogènes α humain

hERß: récepteur des œstrogènes β humain

EFM: Estrogen-free medium. Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 4.5 % charcoal/dextran-treated FBS, 1.9 % L-glutamine, and 0.9 % Pen-Strep.

ER: Estrogen receptor (récepteur des œstrogènes)

ERE: Estrogen Response Element (élément de réponse aux œstrogènes)

ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (Comité de coordination inter-agences pour la validation des méthodes alternatives)

LDAP: Ligne directrice pour les essais axée sur la performance

▼M8

«Me-too test»: en langage familier, essai structurellement et fonctionnellement similaire à une méthode de référence validée et acceptée. Synonyme de «méthode d'essai similaire».

Méthodes d'essai de référence: les essais sur lesquels repose la ligne directrice 455.

Méthode d'essai validée: essai ayant fait l'objet d'études de validation visant à déterminer sa pertinence (notamment sa précision) et sa fiabilité à des fins spécifiques. Il importe de noter que les performances d'une méthode d'essai validée peuvent être insuffisantes en termes de précision et de fiabilité pour qu'elle soit jugée acceptable pour les besoins envisagés (1).

MMTV: *Mouse Mammary Tumor Virus (virus de tumeur mammaire de souris)*

Morphologie cellulaire: forme et apparence des cellules cultivées en monocouche dans un seul puits d'une plaque de culture tissulaire. Les cellules moribondes présentent souvent une morphologie anormale.

MSO: milieu sans œstrogènes. Il s'agit du milieu de Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) complété par 4,5 % de FBS traité au charbon enrobé de dextrane, 1,9 % de L-glutamine et 0,.9 % de Pen-Strep.

MT: métallothionéine

Normes de performance: normes, fondées sur un essai validé, permettant d'évaluer la comparabilité d'un essai proposé structurellement et fonctionnellement similaire. Elles comprennent: (1) les éléments essentiels de l'essai; (2) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi ceux utilisés pour démontrer les performances acceptables de la méthode d'essai validée; et (3) les niveaux de précision et de fiabilité, comparables à ceux obtenus pour la méthode d'essai validée, que l'essai proposé doit présenter lorsqu'on l'évalue à l'aide des produits chimiques de référence de la liste minimale (1).

OHT: 4-hydroxytamoxifène

PE: perturbation endocrinienne

Pertinence: description de la relation entre l'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité à des fins spécifiques. Elle définit le degré auquel l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'un essai (1).

Précision (concordance): degré de conformité entre les résultats d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance d'un essai et l'un des aspects de sa pertinence. Ce terme et celui de «concordance» sont souvent utilisés indifféremment pour qualifier la proportion de résultats corrects d'un essai (1).

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Reproductibilité inter-laboratoires: mesure du degré auquel différents laboratoires qualifiés qui emploient le même protocole et testent les mêmes substances peuvent produire des résultats similaires en termes qualitatifs et quantitatifs. La reproductibilité inter-laboratoires est déterminée au cours des processus de prévalidation et de validation, et indique dans quelle mesure un essai peut être transféré sans problème entre laboratoires. Elle est parfois désignée par «reproductibilité entre laboratoires» (1).

▼**M8**

Reproductibilité intra-laboratoire: détermination du degré auquel divers membres du personnel qualifié d'un même laboratoire réussissent à obtenir des résultats identiques en ayant recours à un protocole spécifique à des moments différents. Elle est parfois désignée par reproductibilité au sein du laboratoire (1).

RLU: Relative Light Units (unités relatives de luminescence)

RPMI: milieu RPMI 1 640 complété par 0,9 % de Pen-Strep et 8,0 % de sérum bovin fœtal (FBS)

RTP_{Max}: niveau maximum de réponse induite par un produit chimique d'essai, exprimé en pourcentage de la réponse induite par 1 nM de E2 sur la même plaque

Sensibilité: proportion des substances positives/actives qui sont correctement classées par l'essai. Il s'agit d'une mesure de la précision d'un essai produisant des résultats catégoriels, et d'un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'un essai (1).

Spécificité: proportion des substances négatives/inactives qui sont correctement classées par l'essai. Il s'agit d'une mesure de la précision d'un essai produisant des résultats catégoriels, et d'un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'un essai (1).

Substance: au sens du règlement REACH ([1]), une substance désigne un élément chimique et ses composés à l'état naturel ou obtenus par un processus de fabrication, y compris tout additif nécessaire pour préserver leur stabilité et toute impureté résultant du processus mis en œuvre, mais à l'exclusion de tout solvant pouvant être séparé de la substance sans en affecter la stabilité ni modifier la composition. Une définition très similaire est utilisée par le SGH des Nations Unies (1).

Substances d'épreuve de compétence: sous-catégorie des substances de référence indiquées dans les normes de performance, et qu'un laboratoire peut employer pour démontrer sa compétence technique à mettre en œuvre une méthode d'essai normalisée. En général, on sélectionne à cet effet des substances qui représentent toute la gamme des réponses, sont disponibles dans le commerce et pour lesquelles on dispose de données de référence de bonne qualité.

Substance œstrogénique de référence (témoin positif, TP): 17ß-œstradiol (E2, CAS 50-28-2)

TA (Transactivation): initiation de la synthèse de l'ARNm en réponse à un signal chimique spécifique, comme la liaison d'un œstrogène à un récepteur des œstrogènes.

TA ER: transactivation des recepteurs des œstrogènes.

Témoin faiblement positif: substance faiblement active sélectionnée parmi les substances de référence et incluse dans l'ensemble des essais pour aider à garantir leur bon fonctionnement.

([1]) Règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) n° 793/93 du Conseil et le règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission.

▼**M8**

TP (témoin positif): substance fortement active, idéalement le 17ß-œstradiol, incluse dans l'ensemble des essais pour aider à garantir leur bon fonctionnement

TP_{10}: concentration du produit chimique d'essai pour laquelle l'activité mesurée dans le cadre d'un essai agoniste est égale à 10 % de l'activité maximale induite par le témoin positif (E2 à 1 nM pour l'essai STTA), dans chaque plaque

TP_{50}: concentration du produit chimique d'essai pour laquelle l'activité mesurée dans le cadre d'un essai agoniste est égale à 50 % de l'activité maximale induite par le témoin positif (E2 à la concentration de référence propre à la méthode d'essai), dans chaque plaque

TP_{Max}: concentration du produit chimique d'essai induisant la réponse RTP_{Max}

Traitement au charbon enrobé de dextrane: traitement du sérum utilisé pour la culture cellulaire. Souvent nommé«*stripping*» (désorption), ce traitement permet d'éliminer les hormones endogènes et les protéines de liaison associées

Transcription: synthèse de l'ARNm

Transfection stable: procédé consistant à transfecter de l'ADN dans des cellules de culture de manière à ce qu'il intègre leur génome de façon stable, permettant l'expression stable des gènes ainsi transfectés. Des clones de cellules transfectées de façon stable sont ensuite sélectionnés par des marqueurs stables (p. ex. en fonction de leur résistance à la G418).

UVCB: Chemical Substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials (substances chimiques de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matières biologiques)

Validation: processus permettant d'évaluer la fiabilité et la pertinence d'une approche, d'une méthode, d'un essai ou d'un procédé à des fins particulières (1)

VM7: cellules immortalisées d'adénocarcinome qui expriment les récepteurs des œstrogènes de manière endogène

VM7Luc4E2: lignée cellulaire **VM7Luc4E2** dérivée de cellules immortalisées d'adénocarcinome d'origine humaine **VM7**capables d'exprimer les deux types de récepteurs des œstrogènes (ERα et ERβ) de manière endogène, et qui ont été transfectées de façon stable avec le plasmide pGudLuc7.ERE. Ce plasmide contient quatre copies d'un oligonucléotide de synthèse contenant un élément de réponse aux œstrogènes en amont du promoteur du virus de tumeur mammaire de souris (MMTV) ainsi que le gène rapporteur de la luciférase de luciole.

VT (véhicule témoin): solvant utilisé pour solubiliser les substances d'essai et témoins, et faisant l'objet d'un essai sans solutés

▼**M8**

Appendice 2

ESSAI DE TRANSACTIVATION FAISANT INTERVENIR LE RÉCEPTEUR DES ŒSTROGÈNES HUMAIN TRANSFECTÉ DE FAÇON STABLE POUR LA DÉTECTION DE L'ACTIVITÉ ŒSTROGÉNIQUE AGONISTE ET ANTAGONISTE DES SUBSTANCES CHIMIQUES À L'AIDE DE LA LIGNÉE CELLULAIRE HERA-HELA-9903

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES (VOIR AUSSI INTRODUCTION GÉNÉRALE)

1. L'essai de transactivation (TA) s'appuie sur la lignée cellulaire hERα-HeLa-9903 pour identifier les substances présentant une activité œstrogénique agoniste médiée par le récepteur des œstrogènes alpha humain (hERα). L'étude de validation de l'essai de transactivation par transfection stable (STTA) menée par l'Institut japonais de recherche et d'évaluation des produits chimiques, et utilisant une lignée cellulaire hERα -HeLa-9903 pour détecter l'activité agoniste et antagoniste des œstrogènes médiée par le récepteur des œstrogènes α humain (hERα), a démontré la pertinence et la fiabilité de l'essai aux fins prévues (1).

2. Cet essai est conçu spécifiquement pour détecter la transactivation médiée par hERα avec la chimioluminescence comme paramètre de mesure. Cependant, des signaux de luminescence non médiés par les récepteurs ont été rapportés pour des concentrations de phytœstrogènes supérieures à 1 μM en raison de la suractivation du gène rapporteur luciférase (2) (3). Tandis que la courbe dose-réponse indique que l'activation du système ER a véritablement lieu à faible concentration, il convient que l'expression de la luciférase obtenue pour des concentrations élevées de phytœstrogènes ou de composés similaires suspectés d'induire une suractivation du gène rapporteur luciférase par un mécanisme proche de celui des phytœstrogènes soit examinée attentivement dans les systèmes d'essai de TA par ER transfecté de façon stable (appendice1).

3. Il convient de consulter l'«INTRODUCTION GÉNÉRALE» et les«ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI DE LA TA ER» avant de mettre en œuvre le présent essai à des fins réglementaires. Les définitions et abréviations utilisées dans cette méthode d'essai sont indiquées à l'appendice 2.1

PRINCIPE DE L''ESSAI (VOIR AUSSI INTRODUCTION GÉNÉRALE)

4. Le présent essai est utilisé pour signaler la liaison d'un ligand à un récepteur œstrogénique. Une fois cette liaison établie, le complexe récepteur-ligand subit une translocation vers le noyau où il se fixe à certains éléments de réponse de l'ADN et transactive le gène rapporteur de la luciférase de luciole, induisant une augmentation de l'expression cellulaire de l'enzyme luciférase. La luciférine est un substrat transformé par l'enzyme luciférase en produit bioluminescent mesurable quantitativement par un luminomètre. Ainsi, l'activité de la luciférase peut être évaluée rapidement et à faible coût à l'aide des nombreux kits d'essai disponibles dans le commerce.

5. Ce système d'essai utilise la lignée cellulaire hERα-HeLa-9903, dérivée d'une tumeur de col utérin d'origine humaine et comportant deux chimères insérées de façon stable: (i) la chimère d'expression de hERα (encodant la totalité du récepteur humain), et (ii) une chimère du gène rapporteur de la luciférase de luciole portant cinq séquences répétées en tandem d'un élément de réponse aux œstrogènes (ERE) de vitellogénine et régie par un élément promoteur de la métallothionéine (MT) de souris avec motif TATA. Il a été déterminé que le gène chimère de MT de souris avec motif TATA présente les meilleures performances, c'est pourquoi il est communément utilisé. Ainsi, cette lignée cellulaire hERα-HeLa-9903 permet de mesurer la capacité d'un produit chimique d'essai à provoquer une transactivation de l'expression du gène luciférase médiée par hERα.

▼M8

6. Dans le cas de l'essai agoniste des ER, l'interprétation des données est soumise au critère suivant: le niveau de réponse maximum provoqué par un produit chimique d'essai est-il supérieur ou égal à une réponse agoniste correspondant à 10 % de la réponse provoquée par une concentration induisant une réponse maximale du témoin positif, soit 1 nM de 17β-œstradiol (E2), c'est-à-dire la TP_{10}. Dans le cas de l'essai antagoniste des ER, l'interprétation des données est soumise au critère suivant: la réponse montre-t-elle une réduction d'activité d'au moins 30 % par rapport à la réponse induite par le témoin produisant le pic (25 pM de E2), en l'absence de cytotoxicité. L'analyse et l'interprétation des données sont développées plus en détail aux paragraphes 35 – 47.

PROCÉDURE

Lignées cellulaires

7. Cet essai est mis en œuvre avec la lignée cellulaire hERα-HeLa-9903 transfectée de façon stable. Cette lignée peut être obtenue auprès de la banque cellulaire JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources) ([1]) après signature d'un accord de transfert de matériel.

8. Seules des cellules exemptes de mycoplasmes sont utilisées pour cet essai. La meilleure méthode de détection sensible d'une infection mycoplasmique est la RCP-TR (réaction en chaîne par polymérase en temps réel) (4) (5) (6).

Stabilité de la lignée cellulaire

9. Pour contrôler la stabilité de la lignée cellulaire, il convient d'utiliser le E2, le 17α-oestradiol, la 17α-méthyltestostérone et la corticostérone comme étalons de référence pour l'essai agoniste; il convient également que la courbe concentration-réponse complète soit relevée au moins une fois au cours de l'essai sur l'ensemble de la plage de concentrations d'essai présentée dans le tableau 1, et que les résultats soient en accord avec ceux du tableau 1.

10. Dans le cas de l'essai antagoniste, il convient que des courbes de concentration complètes pour deux étalons de référence, le tamoxifène et le flutamide, soient relevées de façon simultanée, avec chaque épreuve. Il conviendra de s'assurer d'une classification qualitative correcte quant au caractère positif ou négatif des deux substances.

Conditions de culture et de dépôt des cellules

11. Les cellules sont maintenues dans un milieu essentiel minimum de Eagle (EMEM) sans rouge de phénol, complémenté par 60 mg/l d'antibiotique (Kanamycine) et 10 % de sérum bovin fœtal traité au charbon enrobé de dextrane (DCC-FBS), dans un incubateur à CO2 (5 % de CO2) à 37 ± 1 °C. Lorsqu'une confluence de 75 – 90 % est atteinte, les cellules peuvent être divisées en sous-cultures de 10 ml contenant $0{,}4 \times 10^5 – 1 \times 10^5$ cellules/ml dans des boîtes pour cultures cellulaires de 100 mm de diamètre. Les cellules sont mises en suspension dans EMEM-FBS à 10 % (ce qui équivaut à EMEM avec DCC-FBS) puis déposées dans les puits d'une microplaque pour obtenir une densité de 1×10^4 cellules/100 µl/puits. Les cellules sont ensuite pré-incubées dans un incubateur à 5 % de CO_2 à 37 ± 1 °C pendant 3 heures avant l'exposition au produit chimique. Le matériel en plastique est exempt de toute activité oestrogénique.

12. Afin de maintenir l'intégrité de la réponse, les cellules cultivées font l'objet de plus d'un passage du stock congelé au milieu conditionné, le nombre de passages ne devant pas dépasser 40. Pour la lignée cellulaire hERα-HeLa-9903, c'est fait en moins de trois mois. Cependant, la performance des cellules peut être diminuée si elles sont cultivées dans des conditions de culture inappropriées.

([1]) JCRB Cell Bank : National Institute of Biomedical Innovation
7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japon Fax : +81-72-641-9812

▼M8

13. Le DCC-FBS peut être préparé conformément à la description de l'appendice 2.2, ou obtenu de sources commerciales.

Critère d'acceptabilité

Étalons de référence positifs et négatifs pour l'essai agoniste des ER

14. Avant et pendant l'étude, la réactivité du système d'essai est vérifiée à l'aide des concentrations appropriées d'un œstrogène fort E2, d'un œstrogène faible (17α-oestradiol), d'un agoniste très faible (17α-méthyltestostérone) et d'un composé induisant une réponse négative (corticostérone). La fourchette des valeurs acceptables découlant de l'étude de validation (2) est présentée au tableau 1. Ces 4 étalons de référence concomitants sont inclus dans chaque expérience et il convient que les résultats soient compris dans les limites acceptables indiquées. Si tel n'est pas le cas, la raison du non-respect des critères d'acceptabilité est déterminée (par exemple au niveau de la manipulation des cellules ou de la qualité et de la concentration des antibiotiques ou du sérum) et l'essai est répété. Lorsqueles critères d'acceptabilité ont été satisfaits, la cohérence dans l'utilisation des matériels de culture cellulaire est essentielle pour garantir une variabilité minimale des valeurs CE_{50}, TP_{50} et TP_{10}. Les quatre étalons de référence concomitants, qui sont incluss dans chaque expérience (menée dans les mêmes conditions, y compris matériels, niveau de passage des cellules et techniciens), garantissent la sensibilité de l'essai dans la mesure où les valeurs de la TP_{10} des trois étalons positifs de référence tombent dans la fourchette acceptable, comme cela doit être aussi le cas pour celles des TP_{50} et CE_{50} quand elles peuvent être calculées (voir tableau 1).

Tableau 1

Fourchette des valeurs acceptables pour les 4 étalons de référence dans le cadre de l'essai agoniste

Nom	$logTP_{50}$	$logTP_{10}$	$logCE_{50}$	Pente de Hill	Plage d'essai
17β- oestradiol (E2) N° CAS: 50-28-2	-11,4~-10,1	<-11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10^{-14}~10^{-8}M
17α-oestradiol N° CAS: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10^{-12}~10^{-6}M
Corticostérone N° CAS: 50-22-6	—	—	—	—	10^{-10}~10^{-4}M
17α-méthyltestostérone No CAS: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	—	—	10^{-11}~10^{-5}M

Étalons de référence positifs et négatifs pour l'essai antagoniste des ER

15. Avant et pendant l'étude, la réactivité du système d'essai est vérifiée à l'aide des concentrations appropriées d'une substance positive (tamoxifène), et d'une substance négative (flutamide). La fourchette des valeurs acceptables découlant de l'étude de validation (2) est présentée au tableau 2. Ces deux étalons de référence concomitants sont inclus dans chaque expérience et il convient que les résultats soient jugés acceptables, conformément aux critères. Si tel n'est pas le cas, la raison du non-respect des critères est déterminée (par exemple au niveau de la manipulation des cellules ou de la qualité et de la concentration des antibiotiques ou du sérum) et l'essai est répété. De plus, les valeurs de CI50 pour une substance positive (le tamoxifène) devront être calculées, les résultats devant se situer dans des limites acceptables données. Lorsque les critères d'acceptabilité ont été satisfaits, la cohérence dans l'utilisation des matériels de culture cellulaire est essentielle pour garantir une variabilité minimale des valeurs de CI_{50}. Les deux étalons de référence concomitants, qui sont inclus dans chaque expérience (menée dans les mêmes conditions, y compris matériels, niveau de passage des cellules et techniciens), garantissent la sensibilité de l'essai (voir tableau 2).

▼M8

Tableau 2

Fourchette des valeurs acceptables pour les 2 étalons de référence dans le cadre de l'essai antagoniste

Nom	Critère	$LogCI_{50}$	Plage d'essai
Tamoxifène No CAS: 10540-29-1	Positif: CI_{50} devra être calculée	-5,942-7,596	$10^{-10}10^{-5}$M
Flutamide No CAS: 13 311-84-7	Négatif: CI_{30} ne devra pas être calculée	—	10^{-10} 10^{-5}M

Témoin positif et véhicule témoin

16. Le témoin positif (TP) pour l'essai agoniste des ER (1 nM de E2) et pour l'essai antagoniste des ER (10μM TAM) est au minimum tripliqué dans chaque plaque. De même, le véhicule utilisé pour dissoudre le produit chimique d'essai fait l'objet au minimum d'un essai réalisé en triplicat dans chaque plaque en tant que véhicule témoin (VT). Outre ce VT, quand le TP utilise un véhicule différent de celui du produit chimique d'essai, cet autre véhicule fait également l'objet d'un essai de contrôle réalisé au moins en triplicat sur la même plaque que le TP.

Critères de qualité pour l'essai agoniste des ER

17. L'activité luciférase moyenne du témoin positif (1 nM de E2) est au moins 4 fois l'activité moyenne du VT pour chaque plaque. Le choix de ce critère est fondé sur la fiabilité des valeurs des paramètres d'évaluation tirées de l'étude de validation (historiquement des multiplications d'induction de quatre à 30 fois).

18. En matière de contrôle de la qualité de l'essai, il convient que l'augmentation d'induction correspondant à la TP_{10} du témoin positif concurrent (1 nM de E2) dépasse de 1 + 2 ET (écarts-types) la valeur de l'induction (= 1) du VT concurrent. À des fins d'établissement des priorités, la TP_{10} peut s'avérer utile pour simplifier l'analyse des données nécessaire par rapport à une analyse statistique. L'analyse statistique fournit certes des informations concernant la signification statistique, mais ne constitue pas pour autant un paramètre quantitatif concernant le potentiel relatif à la concentration, et présente donc moins d'intérêt pour l'établissement des priorités.

Critères de qualité pour l'essai antagoniste des ER

19. L'activité luciférase moyenne du témoin produisant le pic (25 pM de E2) est au moins 4 fois l'activité moyenne du VT pour chaque plaque. Le choix de ce critère est fondé sur la fiabilité des valeurs des paramètres d'évaluation tirées de l'étude de validation.

20. En matière de contrôle de la qualité de l'essai, il convient que l'activation transcriptionnelle relative (ATR) de 1nM de E2 dépasse 100 %, la ATR de 1μM de 4-hydroxytamoxifène (OHT) soit inférieure à 40.6 % et l'ATR de 100 μM de digitonine (Dig) soit inférieure à 0 %

Démonstration de la compétence du laboratoire (voir paragraphe 14 et tableaux 3 et 4 de la section«ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE TA ER» de la présente méthode d'essai).

Véhicule

21. Le diméthylsulfoxyde (DMSO), ou un solvant approprié, est utilisé comme véhicule témoin concurrent à la même concentration pour les témoins négatif et positif ainsi que pour les produits chimiques d'essai. Les produits chimiques d'essai sont dissouts dans un solvant capable de les solubiliser et miscible avec le milieu cellulaire. L'eau, l'éthanol (pureté entre 95 % et 100 %) et le DMSO conviennent à cet effet. En cas d'emploi du DMSO, sa teneur ne dépasse pas 0.1 % (v/v). Pour tout véhicule, il convient de démontrer que le volume maximum utilisé n'est pas cytotoxique et qu'il n'interfère pas avec les performances de l'essai.

▼M8

Préparation des produits chimiques d'essai

22. Les produits chimiques d'essai sont en général dissouts dans du DMSO ou un autre solvant approprié. Cette préparation est alors fractionnée en séries de solutions identiques diluées au 1/10 dans le même solvant. Ces dernières sont destinées à la dilution avec les milieux.

Solubilité et cytotoxicité: essai préliminaire de détermination des concentrations

23. Un essai préliminaire est nécessaire afin de déterminer la plage de concentrations appropriée pour le produit chimique d'essai, et de vérifier si cette dernière est susceptible de présenter des problèmes de solubilité ou de cytotoxicité. Tout d'abord, les produits chimiques sont testés jusqu'à une concentration maximale de 1 µl/ml, 1 mg/ml, ou 1 mM, la concentration résultante la plus basse étant retenue. En fonction de la cytotoxicité ou de l'absence de solubilité observée dans l'essai préliminaire, la première des épreuves teste le produit chimique à des dilutions en série logarithmiques commençant par la concentration maximale admissible (par exemple 1 mM, 100 µM, 10 µM, etc.; toute apparition d'un trouble ou d'un précipité est notée. L'épreuve est répétée une seconde fois, et une troisième si nécessaire, en ajustant les concentrations de manière à mieux caractériser les courbes dose-concentration et à éviter les concentrations auxquelles le produit chimique se révèle insoluble ou excessivement cytotoxique.

24. Dans le cas des agonistes et des antagonistes des ER, l'interprétation des données prend en compte l'influence de degrés de cytotoxicité croissants pouvant altérer de façon importante, voire éliminer, la réponse sigmoïde type. Il convient de mettre en œuvre des méthodes de mesure de la cytotoxicité, permettant de recueillir des données sur une viabilité des cellules de 80 %, à l'aide d'un essai adapté éprouvé en laboratoire.

25. Si les résultats de l'essai de cytotoxicité indiquent que la concentration du produit chimique d'essai a abouti à une réduction supérieure ou égale à 20 % du nombre de cellules, cette concentration est alors considérée comme cytotoxique et toutes les concentrations supérieures ou égales à ce seuil de cytotoxicité sont exclues de l'évaluation.

Exposition au produit chimique d'essai et organisation de la plaque d'essai

26. La procédure relative à la dilution des produits chimiques (étapes 1 et 2) et à l'exposition aux cellules (étape 3) peut être menée comme suit:

Étape 1: chaque produit chimique d'essai fait l'objet d'une dilution en série dans le DMSO, ou un solvant approprié, puis est déposé dans les puits d'une plaque microtitre de façon à obtenir les séries de concentrations finales fixées auparavant lors de l'essai préliminaire de détermination des concentrations [typiquement dans une gamme couvrant, par exemple, 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM et 10 pM (10^{-3}-10^{-11} M)] pour des essais en triplicat.

Étape 2: dilution du produit chimique: diluer tout d'abord 1,5 µl deproduit chimique d'essai dans le solvant pour obtenir 500 µl de milieu.

Étape 3: exposition des cellules au produit chimique: ajouter 50 µl de la dilution dans le milieu (préparé à l'étape 2) dans un puits d'essai contenant 10^4 cellules/100 µl/puits.

Le volume final de milieu recommandé dans chaque puits est de 150 µl. Les échantillons d'essai et les étalons de référence peuvent être répartis comme indiqué dans le tableau 3 et dans le tableau 4.

▼**M8**

Tableau 3

Exemple de répartition des concentrations des étalons de référence dans la plaque d'essai dans l'essai agoniste des ER

Ligne	17α-méthyltestostérone			Corticostérone			17α-oestradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc 1 (10 μM)	→	→	100 μM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	conc 2 (1 μM)	→	→	10 μM	→	→	100 nM	→	→	1 Nm	→	→
C	conc 3 (100 nM)	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	conc 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	conc 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	conc 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	conc 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VT	→	→	→	→	→	TP	→	→	→	→	→

VT: véhicule témoin (0,1 % de DMSO); TP: témoin positif (1 nM de E2)

27. Les étalons de référence (E2, 17α-oestradiol, 17α-méthyltestostérone et corticostérone) sont inclus dans chaque épreuve (tableau 3). Chaque plaque d'essai inclut également des puits contenant le TP, traités avec 1 nM de E2 pouvant provoquer une induction maximale de E2, et des puits contenant le véhicule témoin (VT), traités avec le DMSO (ou un solvant approprié) seul (tableau 4). Si des cellules issues de sources différentes (divergeant par leur nombre de passage ou leur lot d'origine par exemple) sont utilisées dans la même expérience, les étalons de référence sont testés avec chacune de ces sources cellulaires.

Tableau 4

Exemple de répartition des concentrations des produits chimiques d'essai et des étalons témoins dans la plaque d'essai dans l'essai agoniste des ER

Ligne	Produit chimique d'essai 1			Produit chimique d'essai 2			Produit chimique d'essai 3			Produit chimique d'essai 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc 1 (10 μM)	→	→	1 mM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	conc 2 (1 μM)	→	→	100 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	conc 3 (100 nM)	→	→	10 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→

▼**M8**

Ligne	Produit chimique d'essai 1			Produit chimique d'essai 2			Produit chimique d'essai 3			Produit chimique d'essai 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	conc 4 (10 nM)	→	→	1 µM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	conc 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	conc 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	conc 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VT	→	→	→	→	→	TP	→	→	→	→	→

VT: véhicule témoin (DMSO); TP: témoin positif (1 nM de E2)

Table 5

Exemple de répartition des concentrations des étalons de référence dans la plaque d'essai dans l'essai antagoniste des ER

	Tamoxifèn			Flutamide			Produit chimique d'essai			Produit chimique d'essai 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**conc 1 (10 µM)**	→	→	**10 µM**	→	→	**10 µM**	→	→	**10 µM**	→	→
B	**conc 2 (1 µM)**	→	→	**1 µM**	→	→	**1 µM**	→	→	**1 µM**	→	→
C	**conc 3 (100 nM)**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→
D	**conc 4 (10 nM)**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→
E	**conc 5 (1 nM)**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→
F	**conc 6 (100 pM)**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→
G	**0,1% DMSO**	→	→	→	→	→	**1 µM OHT**	→	→	**100 µM Dig**	→	→
H	**VT**	→	→	→	→	→	**TP**	→	→	→	→	→

VT: véhicule témoin (0.1% DMSO), TP: témoin positif (1 nM de E2), OHT:4-Hydroxytamoxifène, Dig: Digitonin.

= Puits contenant 25pM de E2 pour produire le pic

28. Pour évaluer l'activité antagoniste des produits chimiques, on devra ajouter dans les puits d'essai placés aux lignes de A à G 25pM de E2 pour produire le pic. Les étalons de référence (tamoxifène et flutamide) sont inclus dans chaque épreuve. Chaque plaque d'essai inclut également des puits contenant le TP, traités avec 1 nM de E2 pouvant servir de contrôle de qualité de la lignée cellulaire hERα-HeLa-9903, des puits contenant le véhicule témoin (VT) traités avec le DMSO (ou un solvant approprié), des puits contenant 0,1 % DMSO, traités avec du DMSO ajouté à la concentration de E2 produisant le pic et correspondant ainsi au«témoin produisant le pic», des puits contenant 1 µM OHT et des puits contenant 100 µM de Dig (tableau 5). Les autres plaques d'essai suivent la même disposition dans la plaque, sans les puits des étalons de référence (tableau 6). Si des cellules issues de sources différentes (divergeant par leur nombre de passage ou leur lot d'origine par exemple) sont utilisées dans la même expérience, les étalons de référence sont testés avec chacune de ces sources cellulaires.

▼M8

Table 6

Exemple de répartition des concentrations des produits chimiques d'essai et des étalons témoins dans la plaque d'essai dans l'essai antagoniste des ER

	Produit chimique d'essai 1			Produit chimique d'essai 2			Produit chimique d'essai 3			Produit chimique d'essai 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	conc 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	conc 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	conc 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	conc 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	conc 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1% DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VT	→	→	→	→	→	TP	→	→	→	→	→

VT: véhicule témoin (0,1% DMSO), TP: témoin positif (1 nM de E2), OHT:4-Hydroxytamoxifène, Dig: Digitonin

: Puits contenant 25pM de E2 pour produire le pic

29. L'absence d'effets de bord est confirmée, le cas échéant, et en cas de suspicion, la répartition dans la plaque est modifiée de façon à éliminer de tels effets, par exemple en n'utilisant pas les puits situés sur les bords.

30. Après l'ajout des produits chimiques, les plaques d'essai sont placées dans un incubateur à 5 % de CO_2, à 37 ± 1°C pendant 20 à 24 heures, afin d'induire la synthèse de produits de gènes rapporteurs.

31. Lorsque les composés sont hautement volatils, des considérations particulières s'appliquent. Dans ces cas, les puits témoins adjacents peuvent en effet induire des faux positifs, à comparer avec les valeurs témoins attendues et historiques. Dans les rares cas où la volatilité pourrait s'avérer problématique, l'utilisation d'un dispositif d'étanchéité est recommandée afin d'isoler efficacement les puits les uns des autres pendant le déroulement de l'essai.

32. Pour un même produit chimique, les essais définitifs sont répétés à des jours différents afin de garantir l'indépendance des résultats.

Essai luciférase

33. Il est possible d'utiliser pour cet essai un réactif d'essai luciférase commercial [par exemple le Système d'essai luciférase Steady-Glo® (Promega, E2510, ou équivalent)] ou un système d'essai luciférase standard (par exemple, Promega, E1500, ou équivalent), tant que les critères d'acceptabilité sont satisfaits. Les réactifs d'essai sont choisis en fonction de la sensibilité du luminomètre utilisé. Dans le cas d'un système d'essai luciférase standard, l'utilisation d'un agent de lyse cellulaire (par exemple, Promega, E1531, ou équivalent) est nécessaire avant l'ajout du substrat. Les instructions à suivre pour l'utilisation du réactif luciférase sont fournies par le fabricant.

ANALYSE DES DONNÉES

Essai agoniste des ER

34. Dans le cas de l'essai agoniste des ER, l'activité transcriptionnelle relative au TP (1 nM de E2) est obtenue par analyse des signaux luminescents dans une même plaque en suivant les étapes suivantes (d'autres traitements mathématiques équivalents sont aussi acceptables):

Étape 1. Calculer la valeur moyenne correspondant au VT.

▼M8

Étape 2. Soustraire cette valeur moyenne correspondant au VT de la valeur obtenue pour chaque puits afin de normaliser les données.

Étape 3. Calculer la moyenne des valeurs normalisées pour le TP.

Étape 4. Diviser la valeur normalisée obtenue pour chaque puits de la plaque par la moyenne des valeurs normalisées pour le TP (TP = 100 %).

Le résultat final obtenu dans chaque puits correspond à l'activité transcriptionnelle relative de ce puits par rapport à la réponse correspondant au TP.

Étape 5. Calculer la valeur moyenne de l'activité transcriptionnelle relative pour chaque groupe de concentration du produit chimique d'essai. Les résultats livrent deux informations: l'activité transcriptionnelle moyenne (réponse) et la concentration induisant cette réponse (voir section suivante).

Détermination des inductions CE_{50}, TP_{50} et TP_{10}

35. Le calcul de la CE_{50} se fonde sur une courbe concentration-réponse complète, dont le relevé n'est pas toujours possible ou pratique en raison d'éventuelles limitations de la plage de concentrations (par exemple en cas de problèmes de cytotoxicité ou de solubilité). Cependant, la CE_{50} et le niveau d'induction maximum (correspondant à la valeur maximale de l'équation de Hill) étant des valeurs informatives, elles sont signalées dans la mesure du possible. Le calcul de la CE_{50} et du niveau d'induction maximum s'effectue à l'aide d'un logiciel statistique adapté, comme Graphpad Prism. Si l'équation logistique de Hill est applicable aux données concentration-réponse, la CE_{50} est calculée par l'équation suivante (15):

$Y = base + (sommet - base) / (1 + 10 \exp ((\log CE_{50} - X) \times pente\ de\ Hill))$
Où:

X est le logarithme de la concentration; et,

Y est la réponse, mesurée entre la base et le sommet de la courbe sigmoïde. La base est fixée à zéro dans l'équation logistique de Hill.

36. Les données suivantes sont fournies pour chacun des produits chimiques d'essai:

la RTP_{Max}, qui indique le niveau de réponse maximum induit par le produit chimique d'essai, exprimée en pourcentage de la réponse induite par 1 nM de E2 sur la même plaque, ainsi que la TP_{Max} (concentration correspondant à la RTP_{Max}); et

pour les produits chimiques positifs, les concentrations correspondant à la TP_{10} et, le cas échéant, la TP_{50}.

37. La valeur TP_x peut être calculée par interpolation entre deux points de la courbe X-Y, l'un situé immédiatement au dessus et l'autre immédiatement en dessous de la valeur TP_x recherchée. Considérant que ces points immédiatement au dessus et en dessous de la valeur TP_x ont pour coordonnées respectives (a,b) et (c,d), la valeur TP_x peut être calculée à l'aide de l'équation suivante:

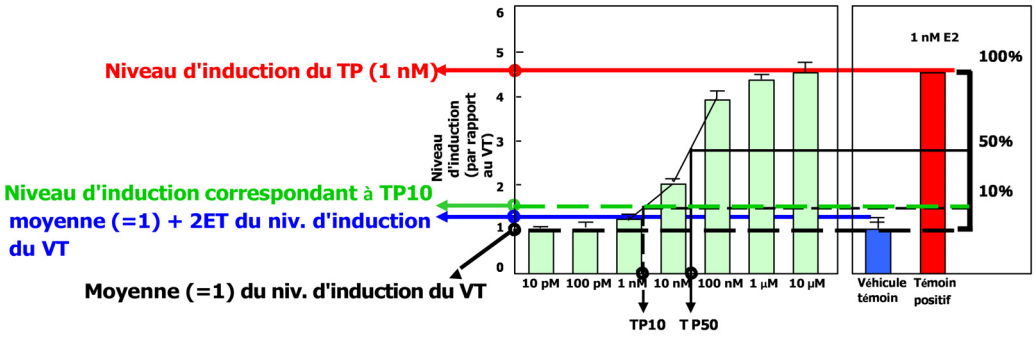
$\log[TPx] = \log[c] + (x - d) / (d - b)$

▼M8

38. La description des valeurs relatives au TP est représentée par la figure 1 ci-dessous.

Figure 1

Exemple de déduction des valeurs relatives au TP. Le TP (1 nM de E2) est inclus dans chaque plaque d'essai



Essai antagoniste des ER

39. Dans le cas de l'essai antagoniste des ER, l'activité transcriptionnelle relative (ATR) au témoin produisant le pic (25 pM de E2) est obtenue par analyse des signaux luminescents dans une même plaque en suivant les étapes suivantes (d'autres traitements mathématiques équivalents sont aussi acceptables):

Étape 1. Calculer la valeur moyenne correspondant au VT.

Étape 2. Soustraire cette valeur moyenne correspondant au VT de la valeur obtenue pour chaque puits afin de normaliser les données. Étape 3. Calculer la moyenne des valeurs normalisées pour le témoin produisant le pic.

Étape 4. Diviser la valeur normalisée obtenue pour chaque puits de la plaque par la moyenne des valeurs normalisées pour le témoin produisant le pic (témoin produisant le pic = 100 %).

Le résultat final obtenu dans chaque puits correspond à l'activité transcriptionnelle relative de ce puits par rapport à la réponse correspondant au témoin produisant le pic.

Étape 5. Calculer la valeur moyenne de l'activité transcriptionnelle relative pour chaque groupe de concentration.

Détermination des inductions CI_{30} et CI_{50}

40. Pour les produits chimiques positifs, les concentrations correspondant à la TP_{10} et, le cas échéant, la TP_{50}, sont fournies.

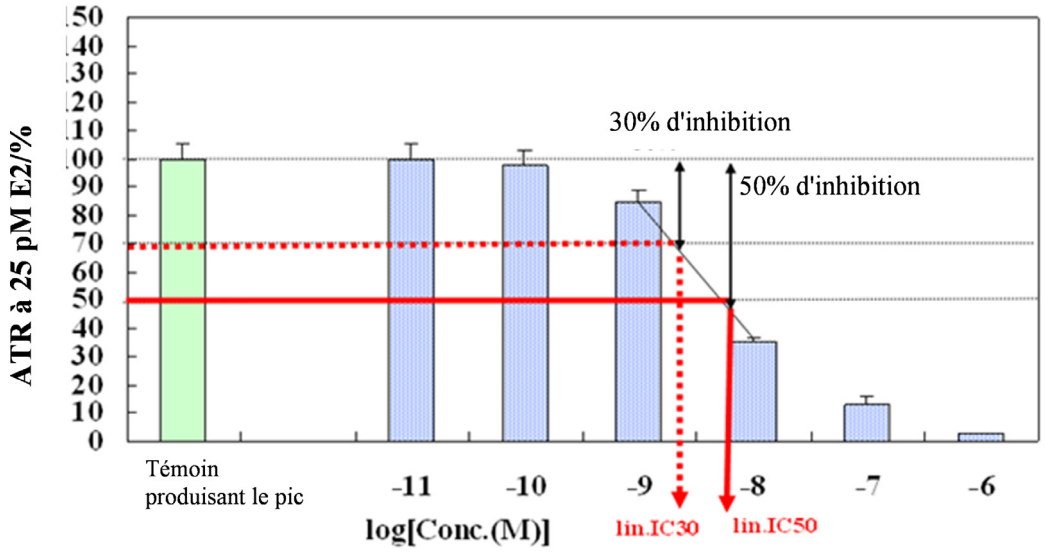
41. La valeur IC_x peut être calculée par interpolation entre deux points de la courbe X-Y, l'un situé immédiatement au-dessus et l'autre immédiatement en dessous de la valeur IC_x recherchée. Considérant que ces points immédiatement au-dessus et en dessous de la valeur IC_x ont pour coordonnées respectives (c,d) et (a,b), la valeur IC_x peut être calculée à l'aide de l'équation suivante:

lin CIx = a - (b - (100 - x)) (a - c) / (b - d)

▼M8

Figure 2

Exemple de déduction des valeurs relatives à la CI. Le témoin produisant le pic (25 pM de E2) est inclus dans chaque plaque d'essai



ATR: activité transcriptionnelle relative

42. Les résultats s'appuient sur deux (ou trois) épreuves indépendantes. Si deux épreuves livrent des résultats comparables et par conséquent reproductibles, une troisième épreuve ne sera pas nécessaire. Pour être acceptables, il convient que les résultats:

— répondent aux critères d'acceptabilité (voir les critères d'acceptabilité paragraphes 14-20);

— soient reproductibles.

Critères d'interprétation des données

Tableau 7

Critères d'interprétation des résultats positifs et négatifs pour les essais agonistes des ER

Positif	Si la RTP_{Max} obtenue est supérieure ou égale à 10 % de la réponse du témoin positif dans deux essais sur deux, ou au moins deux épreuves sur trois.
Négatif	Si la RTP_{Max} obtenue demeure inférieure à 10 % de la réponse du témoin positif dans deux épreuves sur deux, ou deux épreuves sur trois.

Tableau 8

Critères d'interprétation des résultats positifs et négatifs pour les essais antagonistes des ER

Positif	Si la CI_{30} est calculée dans deux essais sur deux, ou au moins deux épreuves sur trois.
Négatif	Si on ne peut pas calculer la CI_{30} dans deux épreuves sur deux, ou deux épreuves sur trois.

▼**M8**

43. Les critères d'interprétation des données sont présentés aux tableaux 7 et 8. Les résultats positifs se caractérisent à la fois par l'amplitude de l'effet induit et par la concentration correspondant à cet effet. L'expression des résultats sous forme de concentration induisant une réponse égale à 50 % (TP_{50}) ou 10 % (TP_{10}) des réponses obtenues avec le TP permet de répondre à ce double objectif. Cependant, un produit chimique d'essai sera jugé positif si sa réponse maximale induite (RTP_{Max}) est supérieure ou égale à 10 % de la réponse du témoin positif dans deux essais sur deux, ou au moins deux épreuves sur trois, mais elle sera jugée négative si la RTP_{Max} demeure inférieure à 10 % de la réponse du TP dans deux épreuves sur deux, ou deux épreuves sur trois.

44. Les valeurs TP_{10}, TP_{50} et TP_{Max} dans l'essai agoniste et CI_{30} et CI_{50} dans l'essai antagoniste peuvent être obtenues à l'aide d'une feuille de calcul disponible avec la Ligne directrice pour les essais sur le site Internet public de l'OCDE ([1]).

45. Deux essais répétés devraient suffire pour déterminer la TP_{10} ou la TP_{50} ou la CI_{30} ou la CI_{50}. Néanmoins, si le niveau de référence des données dans la même plage de concentrations présente un coefficient de variation (CV; %) trop élevé, ces données sont susceptibles d'être considérées comme non valides, et il est nécessaire que l'origine d'une telle variation soit identifiée. Il convient que le CV des données brutes tripliquées (c'est-à-dire des données sur l'intensité de la luminescence) correspondant aux points de calcul de la TP_{10} soit inférieur à 20 %.

46. Le respect des critères d'acceptabilité indique que le système d'essai fonctionne correctement, mais ne garantit pas que chaque épreuve fournisse des données exactes. La duplication des résultats obtenus lors de la première épreuve constitue la meilleure assurance que les valeurs obtenues sont correctes (voir paragraphes 44 et 45).

47. Dans le cas de l'essai agoniste des ER, lorsqu'un supplément d'information est nécessaire, en plus des objectifs de dépistage et de détermination des priorités visés par la présente Ligne directrice concernant les produits chimiques d'essai positifs, en particulier les produits chimiques allant de TP_{10} à TP_{49} ainsi que ceux suspectés d'induire une sur-stimulation de la luciférase, une confirmation que l'activité luciférase observée est due exclusivement à la réponse médiée par ERα peut être obtenue à l'aide d'un antagoniste ERα (voir appendice 2.1).

RAPPORT D'ESSAI

48. Voir le paragraphe 20 de la section«ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE TA ER».

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 225), Organisation de coopération et de développment économiques, Paris.

(2) Escande A., *et al.* (2006). «Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta», *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.

(3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). «Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta», *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

([1]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M8**

(4) Spaepen M., *et al.* (1992). «Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction», FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89-94.

(5) Kobayashi H., *et al.* (1995). «Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products», J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769- 71.

(6) Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). «Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera», *Appl.* Environ. Microbiol., 60(3), 953-9.

(7) De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, Am. J. *Physiol*., 235, E97-El02.

▼**M8**

Appendice 2.1

FAUX POSITIFS: ÉVALUATION DES SIGNAUX DE LUMINESCENCE NON MÉDIÉS PAR LES RÉCEPTEURS

1. Les faux positifs dans l'essai agoniste des ER pourraient trouver leur origine dans l'activation du gène luciférase non médiée par ER, dans l'activation directe d'un produit du gène, ou dans une fluorescence de source indéterminée. De tels effets se signalent par une courbe dose-réponse incomplète ou inhabituelle. En cas de suspicion, l'effet d'un antagoniste du ER (p. ex. 4-hydroxytamoxifène [OHT] à une concentration non toxique) sur la réponse est examiné. Le pur antagoniste ICI 1827 80 ne semble pas indiqué à cette fin dans la mesure où une concentration insuffisante de ICI 1827 80 est susceptible d'abaisser la valeur correspondant au véhicule témoin, perturbant ainsi l'analyse des données.

2. Pour garantir la validité de cette approche, il convient de tester les éléments suivants dans une même plaque:

   — activité agoniste du produit chimique inconnu en présence et absence de 10 μM de OHT;

   — VT (en triplicat);

   — OHT (en triplicat);

   — 1 nM de E2 (en triplicat) comme témoin positif (TP) agoniste;

   — 1 nM de E2 + OHT (en triplicat).

Critères d'interprétation des données

Note: tous les puits contiennent la même concentration de véhicule.

— Si l'activité agoniste du produit chimique inconnu n'est PAS modifiée par le traitement avec l'antagoniste des ER, le résultat est considéré comme«négatif».

— Si l'activité agoniste du produit chimique inconnu est totalement inhibée, les critères d'interprétation sont simplement appliqués.

— Si l'activité agoniste à la plus faible concentration est égale ou supérieure à la réponse du $TP_{10,}$ la substance inconnue est inhibée de façon équivalente ou en excès par rapport à la réponse du TP_{10}. Il convient de calculer la différence entre les réponses relatives aux puits ayant reçu l'antagoniste des ER et celles relatives aux puits ne l'ayant pas reçu. Cette différence entre puits traités et non traités est alors considérée comme la véritable réponse et est utilisée pour calculer les paramètres nécessaires à la décision de classification du produit chimique.

Analyse des données

Vérifier les critères d'acceptabilité.

Vérifier le VT entre les puits traités dans les mêmes conditions.

1. Calculer la valeur moyenne obtenue avec le VT;

2. Soustraire cette valeur moyenne du VT de la valeur obtenue pour chaque puits **non** traité avec OHT;

3. Calculer la moyenne de la réponse obtenue correspondant à OHT;

4. Soustraire la valeur moyenne du VT de la valeur obtenue pour chaque puits traité avec OHT;

5. Calculer la valeur moyenne obtenue avec le TP

6. Calculer l'activité transcriptionnelle relative de tous les autres puits par rapport au TP.

▼**M8**

Appendice 2.2

PRÉPARATION DU SÉRUM TRAITÉ AU CHARBON ENROBÉ DE DEXTRANE (DCC)

1. Le traitement du sérum avec du charbon enrobé de dextrane (DCC) est une méthode générique pour éliminer les composés œstrogéniques contenus dans le sérum ajouté au milieu cellulaire, afin d'exclure de la réponse tout biais causé par des résidus œstrogéniques dans le sérum. Cette procédure permet de traiter 500 ml de sérum bovin fœtal (FBS).

Composants

2. Les matériaux et équipements suivants sont nécessaires:

Matériaux

Charbon actif

Dextrane

Chlorure de magnésium hexahydraté ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)

Sucrose

1 M de solution tampon HEPES (pH 7.4)

Eau ultra pure obtenue par filtration

Équipement

Récipient de verre stérilisé par autoclave (taille à adapter en fonction des besoins) Centrifugeuse de laboratoire classique (température réglable à 4 °C)

Procédure

3. La procédure suivante convient pour des tubes de centrifugeuse de 50 ml:

[Jour 1] Préparer une suspension de charbon enrobé de dextrane dans un litre d'eau ultra pure contenant 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,25 M de sucrose, 2,5 g de charbon, 0,25 g de dextrane et 5 mM de HEPES et agiter à 4 °C pendant toute la nuit.

[Jour 2] Répartir la suspension dans les tubes de 50 ml de la centrifugeuse et centrifuger à 10 000 tours/min et 4 °C pendant 10 minutes. Ôter le surnageant et mettre en réserve une moitié du dépôt de charbon à 4 °C pour l'utiliser le Jour 3. Disperser l'autre moitié du charbon dans du FBS ayant été décongelé lentement pour éviter la formation d'un précipité, puis neutralisé à chaud (56 °C) pendant 30 minutes. Transférer dans un récipient de verre stérilisé par autoclave, comme un erlenmeyer. Agiter la suspension modérément à 4 °C durant toute la nuit.

[Jour 3] Répartir la suspension dans le FBS dans les tubes de 50 mL de la centrifugeuse et centrifuger à 10 000 tours/min et 4 °C pendant 10 minutes. Recueillir le FBS pour le transférer avec la portion de charbon préparée et mise en réserve le Jour 2. Disperser ce dépôt de charbon dans le FBS et agiter modérément à 4 °C durant toute la nuit.

[Jour 4] Répartir la suspension pour une centrifugation à 10 000 tours/min et 4 °C pendant 10 minutes. Stériliser le surnageant par filtration sur filtre stérile 0,2 μm. Ce FBS traité au DCC est conservé à -20 °C et demeure utilisable un an maximum.

▼**M8**

Appendice 3

ESSAI DE TRANSACTIVATION FAISANT APPEL AU RÉCEPTEUR D'ŒSTROGÈNE VM7LUC POUR IDENTIFIER LES SUBSTANCES CHIMIQUES PRÉSENTANT UNE ACTIVITÉ ŒSTROGÉNIQUE AGONISTE ET ANTAGONISTE

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES (Voir aussi l'INTRODUCTION GÉNÉRALE)

1. Cet essai fait appel à la lignée cellulaire VM7Luc4E2 ([1]). La méthode d'essai de TA ER VM7Luc a été validée par le National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), et par le Comité de coordination inter-agences pour la validation des méthodes alternatives (ICCVAM). Les lignées cellulaires VM7Luc expriment majoritairement les ERα et une quantité minime de ERβ, de manière endogène (2) (3) (4).

2. Le présent essai s'applique à un large éventail de substances, à condition que celles-ci soient solubles dans le diméthylsulfoxyde (DMSO, n° CAS 67-68-5), ne réagissent pas avec ce solvant ni avec le milieu de culture cellulaire, et ne soient pas cytotoxiques aux concentrations d'essai. Si l'emploi du DMSO est impossible, on pourra utiliser un autre véhicule, comme l'éthanol ou l'eau (voir paragraphe 12). Les démonstrations du fonctionnement de l'essai de TA ER VM7Luc pour l'effet (ant)agoniste suggèrent que les données ainsi obtenues pourraient livrer des informations sur les mécanismes d'action médiés par les ER, et servir à déterminer quelles substances tester en priorité.

3. Cet essai est conçu spécifiquement pour détecter la transactivation médiée par les hERα et les hERß avec la chimioluminescence comme paramètre de mesure. Les bio-essais ont fréquemment recours à la chimioluminescence car la luminescence jouit d'un rapport signal/bruit élevé. Cependant, dans les essais cellulaires, l'activité de la luciférase de luciole peut être perturbée par les substances qui inhibent l'enzyme luciférase, ce qui se traduit par des résultats décrivant soit une inhibition, soit une augmentation de la luminescence due à la stabilisation de la protéine. En outre, dans certains essais faisant appel au gène rapporteur luciférase activé par les ER, on a pu observer des signaux de luminescence non médiés par les récepteurs pour des concentrations de phytœstrogènes supérieures à 1 μM en raison de la suractivation du gène rapporteur luciférase (9) (11). Tandis que la courbe dose-réponse indique que l'activation du système ER a véritablement lieu à faible concentration, il convient que l'expression de la luciférase obtenue pour des concentrations élevées de phytœstrogènes ou de composés similaires suspectés d'induire une suractivation du gène rapporteur luciférase par un mécanisme proche de celui des phytœstrogènes soit examinée attentivement dans les systèmes d'essai de TA par ER transfecté de façon stable

4. Il convient de consulter l'«INTRODUCTION GÉNÉRALE» et les«ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE TA ER» avant de mettre en œuvre le présent essai à des fins réglementaires. Les définitions et abréviations utilisées dans cette méthode d'essai sont indiquées à l'appendice 1.

([1]) Avant juin 2016, cette lignée cellulaire était désignée lignée cellulaire BG1Luc. Les cellules BG-1 ont été décrites à l'origine par Geisinger et al. (1998) (12) et ont été ultérieurement caractérisées par les chercheurs du National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (13). Relativement récemment, on a découvert qu'il existe en fait deux variants différents des cellules BG-1 utilisées par les chercheurs, BG-1 Fr et BG-1 NIEHS. Une analyse approfondie, incluant des tests sur l'ADN, de ces deux lignées cellulaires BG-1 menée par Li et al (2014) (14) a montré que BG-1 Fr était unique et que BG-1 NIEHS, c'est à dire la lignée cellulaire d'origine utilisée pour le développement de l'essai n'était pas la lignée cellulaire d'adénocarcinome ovarien d'origine humaine, mais était en fait un variant de la lignée cellulaire MCF7 de cancer du sein d'origine humaine. La lignée cellulaire utilisée dans l'essai, citée à l'origine comme étant BG1Luc4E2 (15), est maintenant désignée VM7Luc4E2 («V» = variant; «M7» = cellules MCF7). De même, l'essai est maintenant désigné VM7Luc ER TA. Alors que cela modifie l'origine de la lignée cellulaire sur laquelle l'essai est basé, cela n'affecte pas les études de validation publiées ni l'utilité et l'application de cet essai pour la détection des produits chimiques oestrogéniques et anti-oestrogéniques

▼M8

PRINCIPE DE L'ESSAI (VOIR AUSSI L'INTRODUCTION GÉNÉRALE)

5. L'essai sert à indiquer la formation d'une liaison entre ER et ligand, suivie par la translocation du complexe récepteur-ligand ainsi formé vers le noyau. Dans le noyau, le complexe récepteur-ligand se fixe à certains éléments de réponse de l'ADN et transactive le gène rapporteur (*luc*), induisant la production de luciférase et donc l'émission de lumière, laquelle est mesurée à l'aide d'un luminomètre. Ainsi, l'activité de la luciférase peut être évaluée rapidement et à faible coût à l'aide de différents kits disponibles dans le commerce. L'essai de TA ER VM7Luc s'appuie sur une lignée cellulaire d'adénocarcinome du sein d'origine humaine exprimant les ER (BG-1), transfectée de façon stable avec une chimère du gène rapporteur de la luciférase de luciole (*luc*) régulée par quatre éléments de réponse auxœstrogènes insérés en amont du promoteur du virus de tumeur mammaire de souris (MMTV), afin de détecter les substances qui présentent une activité œstrogénique agoniste ou antagoniste *in vitro*. Le promoteur du MMTV ne répond que faiblement aux autres hormones stéroïdiennes ou non stéroïdiennes (8). Les critères d'interprétation des résultats sont décrits en détail au paragraphe 41. En résumé, une réponse positive est caractérisée par une courbe concentration-réponse comportant au moins trois points dont les barres d'erreurs (moyenne ± écart-type) ne se chevauchent pas, ainsi qu'une différence d'amplitude (unités relatives de luminescence normalisées ou RLU) d'au moins 20 % par rapport à la réponse maximale de l'étalon de référence (17β-œstradiol [E2, n° CAS 50-28-2] pour l'essai agoniste, mélange chlorhydrate de raloxifène [RAL; n° CAS 84 449-90-1]/E2 pour l'essai antagoniste).

MODE OPÉRATOIRE

Lignée cellulaire

6. Cet essai fait appel à la lignée cellulaire transfectée de façon stable VM7Luc4E2. Elle est actuellement seulement disponible sous accord de licence technique auprès de l'Université de Californie à Davis (Californie, États-Unis) ([1]), et de Xenobiotic Detection Systems Inc. à Durham (Caroline du Nord, États-Unis) ([2]).

Stabilité de la lignée cellulaire

7. Afin de maintenir la stabilité et l'intégrité de la lignée cellulaire, les cellules cultivées font l'objet de plus d'un passage entre le stock congelé et leur milieu de conservation (voir paragraphe 9). Les cellules ne sont plus cultivées au-delà de 30 passages. S'agissant de la lignée VM7Luc4E2, il faudra trois mois environ pour effectuer les 30 passages.

Conditions de dépôt et de culture des cellules

8. Il convient de suivre les procédures indiquées dans le document Guidance on Good Cell Culture Practice (5) (6) pour assurer la qualité de l'ensemble des matériaux et des méthodes et ainsi garantir l'intégrité, la validité et la reproductibilité de tous les essais réalisés.

9. Les cellules VM7Luc4E2 sont conservées dans le milieu RPMI 1 640 additionné de 0,9 % de Pen-Strep et 8,0 % de sérum bovin fœtal (FBS) dans un incubateur réservé à la culture tissulaire et réglé à 37 °C ± 1 °C, avec une humidité de 90 ± 5 % et une atmosphère contenant 5,0 ± 1 % de CO_2.

10. Lorsque la confluence atteint environ 80 %, les cellules VM7Luc4E2 sont repiquées et conditionnées dans un milieu sans œstrogène pendant 48 heures. Elles sont alors déposées dans des plaques 96 puits pour y être exposées aux produits chimiques d'essai puis on analyse l'induction œstrogène dépendante

([1]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, courriel : msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649

([2]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, courriel : info@dioxins.com, téléphone : 919-688-4804, télécopie : 919-688-4404

▼M8

de l'activité de la luciférase. Le milieu sans œstrogène (MSO) contient le milieu de Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) sans rouge phénol, additionné de 4,5 % de FBS traité au charbon dextran, 1,9 % de L glutamine, et 0,9 % de Pen-Strep. Il convient que le matériel en plastique soit exempt de toute activité œstrogénique [voir protocole détaillé (7)].

Critères d'acceptabilité

11. L'acceptation ou le rejet d'un essai dépendent de l'évaluation des résultats obtenus avec l'étalon de référence et les témoins pour chaque expérience menée dans la plaque 96 puits. Chaque étalon de référence est testé à diverses concentrations, et l'essai comprend plusieurs réplicats de chaque concentration de l'étalon et des témoins.Les résultats sont ensuite comparés aux critères de qualité pour ces paramètres, qui découlent des bases de données historiques sur les effets agoniste et antagoniste établies par chaque laboratoire lors de l'épreuve de compétence. Ces bases de données historiques sont constamment mises à jour avec les résultats obtenus pour l'étalon de référence et les témoins. Toute modification des équipements et conditions de laboratoire peut nécessiter le développement de bases de données historiques mises à jour.

Essai de l'effet agoniste

Essai préliminaire

- Induction: on mesure l'effet induit sur la plaque en divisant la valeur moyenne des unités relatives de luminescence (RLU) maximales obtenues avec l'étalon de référence E2 par la valeur moyenne des RLU du témoin DMSO. On observe généralement une induction multipliée par cinq, mais un essai est accepté s'il permet d'obtenir au moins une induction multipliée par quatre.

- Résultats du témoin DMSO: il convient que les RLU du solvant témoin ne dépassent pas 2,5 fois l'écart-type de la valeur moyenne historique des RLU du solvant témoin.

- Si l'un de ces critères n'est pas satisfait, l'expérience est invalidée et elle est répétée.

Essai complet

Cet essai est gouverné par les mêmes critères d'acceptabilité que pour l'essai préliminaire de l'effet agoniste, auxquels s'ajoutent les suivants:

- Résultats de l'étalon de référence: il convient que la courbe concentration-réponse de l'étalon de référence E2 corresponde à une sigmoïde et comporte au moins trois valeurs dans sa partie linéaire.

- Résultats du témoin positif: il convient que les valeurs en RLU du témoin méthoxychlore soient supérieures à la valeur moyenne des RLU du DMSO plus trois fois l'écart-type.

- Si l'un de ces critères n'est pas satisfait, l'expérience est invalidée et elle est répétée.

Essai de l'effet antagoniste

Essai préliminaire

- Inhibition: l'effet inhibiteur sur la plaque est mesuré en divisant la valeur moyenne des unités relatives de luminescence (RLU) maximales obtenues avec l'étalon de référence Ral/E2 par la valeur moyenne des RLU du témoin DMSO. On observe généralement une inhibition de cinq fois la valeur du témoin, mais un essai est accepté s'il permet d'obtenir une inhibition d'au moins trois fois la valeur du témoin.

- Résultats du témoin E2: il convient que les RLU du témoin E2 ne dépassent pas 2.5 fois l'écart-type de la valeur moyenne historique des RLU du E2.

▼M8

- Résultats du témoin DMSO: il convient que les RLU du témoin DMSO ne dépassent pas 2.5 fois l'écart-type de la valeur moyenne historique des RLU du solvant témoin.

- Si l'un de ces critères n'est pas satisfait, l'expérience est invalidée et elle est répétée.

Essai complet

Cet essai est gouverné par les mêmes critères d'acceptabilité que pour l'essai préliminaire de l'effet antagoniste, auxquels s'ajoutent les suivants:

- Résultats de l'étalon de référence: il convient que la courbe concentration-réponse de l'étalon de référence Ral/E2 corresponde à une sigmoïde et comporte au moins trois valeurs dans sa partie linéaire.

- Résultats du témoin positif: il convient que les RLU du témoin tamoxifène/E2 soient inférieures à la moyenne des RLU du témoin E2 moins trois fois l'écart-type.

- Si l'un de ces critères n'est pas satisfait, l'expérience est invalidée et elle est répétée.

Étalons de référence, témoins positifs et véhicule témoin

Véhicule témoin (essais des effets agoniste et antagoniste)

12. Le véhicule employé pour dissoudre les produits chimiques d'essai fait l'objet d'un essai en tant que témoin. Dans l'étude de validation de la méthode d'essai utilisant VM7Luc, ce véhicule était du diméthylsulfoxyde à 1 % volumique (DMSO, n° CAS 67-68-5) (voir paragraphe 24). Si l'on fait appel à un autre véhicule que le DMSO, l'ensemble des étalons de référence, des témoins et des produits chimiques d'essai est testé dans le même véhicule, le cas échéant.

Étalon de référence (essai préliminaire pour l'effet agoniste)

13. L'étalon de référence est le E2 (no CAS 50-28-2). Pour l'essai préliminaire, le E2 fait l'objet d'une série de quatre dilutions ($1{,}84 \times 10^{-10}$, $4{,}59 \times 10^{-11}$, $1{,}15 \times 10^{-11}$ et $2{,}87 \times 10^{-12}$ M), chacune de ces concentrations étant testée dans deux puits.

Étalon de référence (essai complet pour l'effet agoniste)

14. Pour l'essai complet, le E2 fait l'objet d'une série de dilutions successives au 1/2 jusqu'à obtenir 11 concentrations allant de $3{,}67 \times 10^{-10}$ à $3{,}59 \times 10^{-13}$ M, chaque concentration étant testée dans deux puits.

Étalon de référence (essai préliminaire pour l'effet antagoniste)

15. L'étalon de référence est un mélange de Ral (n° CAS 84 449-90-1) et de E2 (n° CAS 50-28-2). Pour l'essai préliminaire, le mélange Ral/E2 fait l'objet d'une série de dilutions permettant d'obtenir trois concentrations différentes de Ral ($3{,}06 \times 10^{-9}$, $7{,}67 \times 10^{-10}$ et $1{,}92 \times 10^{-10}$ M) avec une concentration constante de E2 ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M), chaque dilution étant testée dans deux puits.

Étalon de référence (essai complet de l'effet antagoniste)

16. Pour l'essai complet, on prépare une série de dilutions successives au 1/2 du Ral (allant de $2{,}45 \times 10^{-8}$ à $9{,}57 \times 10^{-11}$ M) avec E2 à concentration constante ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M) pour obtenir neuf concentrations de Ral/E2, testées dans deux puits.

Témoin faiblement positif (agoniste)

17. Le témoin faiblement positif est une solution à $9{,}06 \times 10^{-6}$ M de *p,p'*-méthoxychlore (méthoxychlore, n° CAS 72-43-5) dans du MSO.

▼**M8**

Témoin faiblement positif (antagoniste)

18. Le témoin faiblement positif est une solution de tamoxifène (n° CAS 10 540-29-1) à 3,36 x 10^{-6} M et de E2 à 9,18 × 10^{-11} M dans du MSO.

Témoin E2 (essai de l'effet antagoniste uniquement)

19. Le témoin E2 est une solution de E2 à 9,18 × 10^{-11} M dans du MSO, et sert de témoin négatif de référence.

Augmentation de l'induction (effet agoniste)

20. L'activité luciférase induite par l'étalon de référence (E2) est mesurée en divisant la valeur moyenne des RLU maximales obtenues pour le E2 par la valeur moyenne des RLU correspondant au témoin DMSO. Il convient que ce résultat soit plus de quatre fois plus grand.

Augmentation de l'inhibition (effet antagoniste)

21. L'inhibition moyenne de l'activité luciférase observée avec l'étalon de référence (Ral/E2) est calculée en divisant la valeur moyenne des RLU maximales obtenues pour le mélange Ral/E2 par la valeur moyenne des RLU du témoin DMSO. Il convient que ce résultat soit plus de trois fois plus grand.

Démonstration de la compétence du laboratoire (voir paragraphe 14 et tableaux 3 et 4 de la rubrique «ÉLÉMENTS DE L''ESSAI DE TA ER» de la présente méthode d'essai).

Véhicule

22. Les produits chimiques d'essai sont mis en solution dans un solvant capable de les solubiliser et miscible avec le milieu cellulaire. L'eau, l'éthanol (pureté comprise entre 95 % et 100 %) et le DMSO conviennent à cet effet. En cas d'emploi du DMSO, il convient que sa teneur ne dépasse pas 1 % (v/v). Pour tout véhicule, il convient de démontrer que le volume maximum utilisé n'est pas cytotoxique et qu'il n'interfère pas avec les performances de l'essai. Les étalons de référence et les témoins sont dissous dans du solvant pur puis dilués dans le MSO jusqu'à obtenir les concentrations souhaitées.

Préparation des produits chimiques d'essai

23. Les produits chimiques d'essai sont dissouts dans du DMSO pur (ou un autre solvant approprié), puis diluées dans le MSO jusqu'à obtenir les concentrations souhaitées. L'ensemble des produits chimiques d'essai est amené à température ambiante avant la dissolution et la dilution. De nouvelles solutions de produit chimique d'essai sont préparées pour chaque expérience. Il convient qu'elles ne présentent ni précipité, ni trouble. Des solutions mères d'étalon de référence et de témoins peuvent être préparées à l'avance, mais les solutions et dilutions finales de l'étalon de référence, des témoins et des produits chimiques d'essai seront préparées pour chaque expérience et utilisées dans les 24 heures.

Solubilité et cytotoxicité: Prise en compte dans l'essai préliminaire

24. L'essai préliminaire s'appuie sur une série de sept dilutions successives au 1/10 testées en duplicat. Les produits chimiques d'essai sont d'abord évalués à une concentration maximale de 1 mg/mL (environ 1 mM) pour l'effet agoniste, et 20 µg/ml (environ 10 µM) pour l'effet antagoniste. Les essais préliminaires servent à établir les valeurs suivantes:

— concentrations de départ des produits chimiques d'essai mises en œuvre dans les essais complets;

— dilutions des produits chimiques d'essai (au 1/2 ou au 1/5) mises en œuvre dans les essais complets.

▼M8

25. L'évaluation de la viabilité cellulaire et de la cytotoxicité est incluse dans les protocoles d'essai des effets agoniste et antagoniste (7), dans les essais préliminaires comme dans les essais complets. L'essai de cytotoxicité employé pour évaluer la viabilité cellulaire dans l'étude de validation de la méthode de TA ER VM7Luc était fondé sur une méthode d'observation visuelle qualitative par cotation, néanmoins une procédure quantitative peut être mise en œuvre à cette même fin [voir protocole (7)]. Les données relatives aux concentrations du produit chimique d'essai qui entraînent une baisse de viabilité cellulaire supérieure à 20 % sont inutilisables.

Exposition au produit chimique d'essai et organisation de la plaque d'essai

26. Les cellules sont comptées et déposées dans des plaques de culture tissulaire à 96 puits (2 x 10^5 cellules par puits) dans du MSO, puis incubées pendant 24 heures pour leur permettre de s'attacher à la plaque. Le MSO est alors éliminé et remplacé par les solutions de produit chimique d'essai ou de substances de référence dans le MSO, et la plaque est incubée pendant 19 à 24 heures. Les substances très volatiles feront l'objet d'une attention particulière, dans la mesure où elles peuvent donner lieu à de faux positifs quand elles sont à côté de puits contenant un témoin. Le cas échéant, l'utilisation d'un dispositif d'étanchéité pour isoler efficacement les puits les uns des autres pendant le déroulement de l'essai est recommandée.

Essais préliminaires

27. Pour l'essai préliminaire, on utilise l'intégralité d'une plaque 96 puits pour tester jusqu'à six produits chimiques d'essai à sept concentrations différentes obtenues par dilutions successives au dixième et évaluées en duplicat (voir graphiques 1 et 2).

— L'essai préliminaire pour l'effet agoniste requiert quatre concentrations de E2 en duplicat, en tant qu'étalon de référence, ainsi que quatre réplicats du témoin DMSO.

— L'essai préliminaire pour l'effet antagoniste requiert trois concentrations du mélange Ral/E2 (où E2 reste constant à $9{,}18 \times 10^{-11}$ M) en duplicat, en tant qu'étalon de référence, ainsi que trois puits assignés respectivement aux témoins E2 et DMSO.

Graphique 1

Organisation de la plaque 96 puits pour l'essai préliminaire de l'effet agoniste

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC1-1	PC1-1	PC2-1	PC2-1	PC3-1	PC3-1	PC4-1	PC4-1	PC5-1	PC5-1	PC6-1	PC6-1
B	PC1-2	PC1-2	PC2-2	PC2-2	PC3-2	PC3-2	PC4-2	PC4-2	PC5-2	PC5-2	PC6-2	PC6-2
C	PC1-3	PC1-3	PC2-3	PC2-3	PC3-3	PC3-3	PC4-3	PC4-3	PC5-3	PC5-3	PC6-3	PC6-3
D	PC1-4	PC1-4	PC2-4	PC2-4	PC3-4	PC3-4	PC4-4	PC4-4	PC5-4	PC5-4	PC6-4	PC6-4
E	PC1-5	PC1-5	PC2-5	PC2-5	PC3-5	PC3-5	PC4-5	PC4-5	PC5-5	PC5-5	PC6-5	PC6-5
F	PC1-6	PC1-6	PC2-6	PC2-6	PC3-6	PC3-6	PC4-6	PC4-6	PC5-6	PC5-6	PC6-6	PC6-6
G	PC1-7	PC1-7	PC2-7	PC2-7	PC3-7	PC3-7	PC4-7	PC4-7	PC5-7	PC5-7	PC6-7	PC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VT	VT	VT	VT	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Abréviations: E2-1 à E2-4 = concentrations de l'étalon de référence E2 (par ordre décroissant); PC1-1 à PC1-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 1 (PC1); PC2-1 à PC2-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 2 (PC2); PC3-1 à PC3-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 3 (PC3); PC4-1 à PC4-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 4 (PC4); PC5-1 à PC5-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 5 (PC5); PC6-1 à PC6-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 6 (PC6); VT = véhicule témoin (DMSO à 1 % v/v dans le MSO).

▼M8

Graphique 2

Organisation de la plaque 96 puits pour l'essai préliminaire de l'effet antagoniste

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC1-1	PC1-1	PC2-1	PC2-1	PC3-1	PC3-1	PC4-1	PC4-1	PC5-1	PC5-1	PC6-1	PC6-1
B	PC1-2	PC1-2	PC2-2	PC2-2	PC3-2	PC3-2	PC4-2	PC4-2	PC5-2	PC5-2	PC6-2	PC6-2
C	PC1-3	PC1-3	PC2-3	PC2-3	PC3-3	PC3-3	PC4-3	PC4-3	PC5-3	PC5-3	PC6-3	PC6-3
D	PC1-4	PC1-4	PC2-4	PC2-4	PC3-4	PC3-4	PC4-4	PC4-4	PC5-4	PC5-4	PC6-4	PC6-4
E	PC1-5	PC1-5	PC2-5	PC2-5	PC3-5	PC3-5	PC4-5	PC4-5	PC5-5	PC5-5	PC6-5	PC6-5
F	PC1-6	PC1-6	PC2-6	PC2-6	PC3-6	PC3-6	PC4-6	PC4-6	PC5-6	PC5-6	PC6-6	PC6-6
G	PC1-7	PC1-7	PC2-7	PC2-7	PC3-7	PC3-7	PC4-7	PC4-7	PC5-7	PC5-7	PC6-7	PC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VT	VT	VT	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Abréviations: E2 = témoin E2; Ral-1 à Ral-3 = concentrations de l'étalon de référence Raloxifène/E2 (par ordre décroissant); PC1-1 à PC1-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 1 (PC1); PC2-1 à PC2-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 2 (PC2); PC3-1 à PC3-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 3 (PC3); PC4-1 à PC4-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 4 (PC4); PC5-1 à PC5-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 5 (PC5); PC6-1 à PC6-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 6 (PC6); VT = véhicule témoin (DMSO à 1 % v/v dans le MSO).

Note: Tous les produits chimiques d'essai sont testés en présence de E2 à 9.18×10^{-11} M.

28. Le volume final de milieu recommandé dans chaque puits s'élève à 200 µl. On n'utilisera que les plaques d'essai dans lesquelles tous les puits affichent un taux de viabilité cellulaire d'au moins 80 %.

29. La détermination des concentrations de départ pour l'essai complet de l'effet ***agoniste***est décrite de manière exhaustive dans le protocole relatif à cet effet (7). En résumé, on applique les critères suivants:

— Si aucun point de la courbe concentration-réponse du produit chimique d'essai n'est situé au-dessus de la moyenne des résultats du témoin DMSO plus trois fois son écart-type, l'essai complet est mené avec une série de 11 dilutions successives à 1/2, à partir de la concentration de saturation du produit chimique d'essai.

— Si la courbe concentration-réponse du produit chimique d'essai contient des points situés au-dessus de la moyenne des résultats du témoin DMSO plus trois fois son écart-type, l'essai complet utilise une série de 11 dilutions successives à partir d'une concentration supérieure de 1 log à la concentration induisant les RLU ajustées maximales lors de l'essai préliminaire. Cette série de 11 dilutions se fait à 1/2 ou 1/5 en fonction du critère suivant:

Une série de dilutions à 1/2 est préconisée si la gamme de concentrations ainsi obtenue permet d'observer l'ensemble des réponses attendues sur la base de la courbe concentration-réponse obtenue dans l'essai préliminaire. Dans le cas contraire, les dilutions se font au cinquième.

▼**M8**

— Si le produit chimique d'essai affiche une courbe biphasique à l'issue de l'essai préliminaire, il convient que ces deux phases soient aussi étudiées dans l'essai complet.

30. La détermination des concentrations de départ pour l'essai complet de l'effet ***antagoniste*** est décrite de manière exhaustive dans le protocole relatif à cet effet (7). En résumé, on applique les critères suivants:

— Si aucun point de la courbe concentration-réponse du produit chimique d'essai n'est inférieur à la moyenne des résultats du témoin E2 moins trois fois son écart-type, l'essai complet est mené avec une série de 11 dilutions successives à 1/2, à partir de la concentration de saturation du produit chimique d'essai.

— Si la courbe concentration-réponse du produit chimique d'essai présente des points inférieurs à la moyenne des résultats du témoin E2 moins trois fois son écart-type, l'essai complet est mené avec une série de 11 dilutions successives à partir d'une des concentrations suivantes:

• la concentration qui donne la valeur la plus faible (RLU ajustées) dans l'essai préliminaire;

• la concentration maximale avant saturation [voir protocole pour l'effet antagoniste (7), graphique 14-2];

• la concentration minimale induisant un effet cytotoxique [voir protocole pour l'effet antagoniste (7), graphique 14-3 pour un exemple en la matière].

— Cette série de 11 dilutions se fera à 1/2 ou 1/5 en fonction du critère suivant:

Une série de dilutions à 1/2 est préconisée si la gamme de concentrations ainsi obtenue permet d'observer l'ensemble des réponses attendues sur la base de la courbe concentration-réponse obtenue dans l'essai préliminaire. Dans le cas contraire, les dilutions se feront au cinquième.

Essais complets

31. L'essai complet fait appel à une série de 11 dilutions successives (à 1/2 ou 1/5, selon la concentration de départ sélectionnée en fonction des critères pertinents), chaque concentration étant testée dans trois puits de la plaque 96 puits (voir graphiques 3 et 4).

— L'essai complet de l'effet agoniste utilise 11 concentrations de E2 en duplicat comme étalon de référence. Sur chaque plaque, quatre puits servent aux réplicats du témoin DMSO, et quatre autres puits sont assignés aux réplicats du témoin méthoxychlore (9,06 x 10-6 M).

— L'essai complet de l'effet *antagoniste* requiert neuf concentrations du mélange Ral/E2 (où E2 reste constant à $9{,}18 \times 10^{-11}$ M) en duplicat, en tant qu'étalon de référence, quatre réplicats du témoin E2 à $9{,}18 \times 10^{-11}$ M, quatre réplicats du témoin DMSO, et quatre réplicats du tamoxifène à $3{,}36 \times 10^{-6}$M.

▼M8

Graphique 3

Organisation de la plaque 96 puits pour l'essai complet de l'effet agoniste

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC1-1	PC1-2	PC1-3	PC1-4	PC1-5	PC1-6	PC1-7	PC1-8	PC1-9	PC1-10	PC1-11	VT
B	PC1-1	PC1-2	PC1-3	PC1-4	PC1-5	PC1-6	PC1-7	PC1-8	PC1-9	PC1-10	PC1-11	VT
C	PC1-1	PC1-2	PC1-3	PC1-4	PC1-5	PC1-6	PC1-7	PC1-8	PC1-9	PC1-10	PC1-11	VT
D	PC2-1	PC2-2	PC2-3	PC2-4	PC2-5	PC2-6	PC2-7	PC2-8	PC2-9	PC2-10	PC2-11	VT
E	PC2-1	PC2-2	PC2-3	PC2-4	PC2-5	PC2-6	PC2-7	PC2-8	PC2-9	PC2-10	PC2-11	Méth
F	PC2-1	PC2-2	PC2-3	PC2-4	PC2-5	PC2-6	PC2-7	PC2-8	PC2-9	PC2-10	PC2-11	Méth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Méth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Méth

Abréviations: PC1-1 à PC1-11 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 1; PC2-1 à PC2-11 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 2; E2-1 à E2-11 = concentrations de l'étalon de référence E2 (par ordre décroissant); Méth = témoin faiblement positif p,p'-méthoxychlore; VT = véhicule témoin DMSO (1 % v/v dans le MSO)

Graphique 4

Organisation de la plaque 96 puits pour l'essai complet de l'effet antagoniste

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC1-1	PC1-2	PC1-3	PC1-4	PC1-5	PC1-6	PC1-7	PC1-8	PC1-9	PC1-10	PC1-11	VT
B	PC1-1	PC1-2	PC1-3	PC1-4	PC1-5	PC1-6	PC1-7	PC1-8	PC1-9	PC1-10	PC1-11	VT
C	PC1-1	PC1-2	PC1-3	PC1-4	PC1-5	PC1-6	PC1-7	PC1-8	PC1-9	PC1-10	PC1-11	VT
D	PC2-1	PC2-2	PC2-3	PC2-4	PC2-5	PC2-6	PC2-7	PC2-8	PC2-9	PC2-10	PC2-11	VT
E	PC2-1	PC2-2	PC2-3	PC2-4	PC2-5	PC2-6	PC2-7	PC2-8	PC2-9	PC2-10	PC2-11	Tam
F	PC2-1	PC2-2	PC2-3	PC2-4	PC2-5	PC2-6	PC2-7	PC2-8	PC2-9	PC2-10	PC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Abréviations: E2 = témoin E2; Ral-1 à Ral-9 = concentrations de l'étalon de référence Raloxifène/E2 (par ordre décroissant); Tam = témoin faiblement positif Tamoxifène/E2; PC1-1 à PC1-11 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 1; PC2-1 à PC2-11 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 2; VT = véhicule témoin DMSO (1 % v/v dans le MSO)

Note:Comme indiqué précédemment, tous les puits contenant l'étalon de référence et le produit chimique d'essai affichent la même concentration de E2 (9,18 x 10^{-11} M).

32. Pour un même produit chimique, les essais complets sont répétés à des jours différents afin de garantir l'indépendance des résultats. On effectue au moins deux essais complets. Si leurs résultats se contredisent (par ex., un essai montre une réponse positive, l'autre une réponse négative), ou si l'un des essais est inadéquat, on procède à un troisième essai.

Mesure de la luminescence

33. La luminescence est déterminée dans une gamme de 300 à 650 nm, à l'aide d'un luminomètre équipé d'un système d'injection et d'un logiciel contrôlant le volume injecté et l'intervalle de mesure (7). L'émission lumineuse observée pour chaque puits est exprimée en RLU par puits.

▼**M8**

ANALYSE DES DONNÉES

Détermination de la CE_{50} et de la CI_{50}

34. La CE_{50} (concentration efficace du produit chimique d'essai correspondant à la moitié de la réponse maximale [effet agoniste]) et la CI_{50} (concentration du produit chimique d'essai induisant la moitié de l'inhibition maximale [effet antagoniste]) sont déterminées à partir des données de la courbe concentration-réponse. S'agissant des produits chimiques d'essai positifs pour une ou plusieurs concentrations, la concentration du produit chimique d'essai qui induit la moitié de la réponse maximale (CI_{50} ou CE_{50}) est calculée à l'aide d'une fonction de Hill ou d'une autre méthode adaptée. La fonction de Hill est un modèle mathématique logistique à quatre paramètres qui associe la concentration du produit chimique d'essai à une réponse (en général selon une fonction sigmoïde) grâce à l'équation suivante:

$$Y = Base + \frac{(Sommet - Base)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)pente\ de\ Hill}$$

Où:

Y = réponse (en RLU);

X = logarithme de la concentration;

Base = réponse minimale;

Sommet = réponse maximale;

$logCE_{50}$ (ou $logCI_{50}$) = logarithme de la concentration correspondant à la réponse située à mi-chemin entre la base et le sommet;

pente de Hill = pente de la courbe.

Le modèle calcule ainsi les résultats les plus proches pour les valeurs de la base, du sommet, de la pente de Hill, de la CI_{50} et de la CE_{50}. Le calcul de la CE_{50} et de la CI_{50} s'effectue à l'aide d'un logiciel statistique adapté, comme Graphpad Prism®.

Détermination des valeurs aberrantes

35. L'adjonction, entre autres, d'un test Q [voir les protocoles pour les effets agoniste et antagoniste (30)] peut favoriser la qualité de l'arbitrage statistique, afin d'établir quels puits «inutilisables» seront exclus de l'analyse des données.

36. En ce qui concerne les réplicats de l'étalon de référence E2 (échantillon composé de deux puits), la valeur en RLU ajustées d'un réplicat pour une concentration donnée de E2 sera considérée comme aberrante si elle diffère de plus de 20 % de la valeur en RLU obtenue pour la même concentration dans la base de données historique.

Collecte et ajustement des données luminométriques pour l'essai préliminaire

37. Les données brutes livrées par le luminomètre sont transférées dans une feuille de calcul type conçue spécialement pour l'essai. On peut ainsi établir si des valeurs aberrantes doivent être exclues. (Voir Critères d'acceptabilité de l'essai pour les paramètres obtenus dans ces analyses). Les calculs suivants sont effectués:

Effet agoniste

Étape 1 Calculer la réponse moyenne du véhicule témoin (VT) DMSO.

Étape 2 Soustraire la valeur moyenne du VT DMSO à la valeur obtenue pour chaque puits afin de normaliser les données.

▼**M8**

Étape 3 Calculer la multiplication moyenne de l'induction observée avec l'étalon de référence (E2).

Étape 4 Calculer la CE_{50} moyenne pour les produits chimiques d'essai.

Effet antagoniste

Étape 1 Calculer la réponse moyenne du véhicule témoin (VT) DMSO.

Étape 2 Soustraire la valeur moyenne du VT DMSO à la valeur obtenue pour chaque puits afin de normaliser les données.

Étape 3 Calculer la multiplication moyenne de l'inhibition observée avec l'étalon de référence (Ral/E2).

Étape 4 Calculer la réponse moyenne de l'étalon de référence E2.

Étape 5 Calculer la CI_{50} moyenne pour les produits chimiques d'essai.

Collecte et ajustement des données luminométriques pour les essais complets

38. Les données brutes livrées par le luminomètre sont transférées dans une feuille de calcul type conçue spécialement pour le présent essai. On peut ainsi établir si des valeurs aberrantes doivent être exclues. (Voir Critères d'acceptabilité de l'essai pour les paramètres obtenus dans ces analyses.) Les calculs suivants sont effectués:

Effet agoniste

Étape 1 Calculer la réponse moyenne du véhicule témoin (VT) DMSO.

Étape 2 Soustraire la valeur moyenne du VT DMSO à la valeur obtenue pour chaque puits afin de normaliser les données.

Étape 3 Calculer la multiplication moyenne de l'induction observée avec l'étalon de référence (E2).

Étape 4 Calculer la CE_{50} moyenne de E2 et des produits chimiques d'essai, respectivement.

Étape 5 Calculer la valeur moyenne en RLU ajustées obtenue avec le méthoxychlore.

Effet antagoniste

Étape 1 Calculer la réponse moyenne du véhicule témoin (VT) DMSO.

Étape 2 Soustraire la valeur moyenne du VT DMSO à la valeur obtenue pour chaque puits afin de normaliser les données.

Étape 3 Calculer la multiplication moyenne de l'induction observée avec l'étalon de référence (Ral/E2).

Étape 4 Calculer la CI_{50} moyenne du mélange Ral/E2 et des produits chimiques d'essai, respectivement.

Étape 5 Calculer la valeur moyenne en RLU ajustées obtenue avec le tamoxifène.

Étape 6 Calculer la réponse moyenne de l'étalon de référence E2.

▼M8

Critères d'interprétation des données

39. La méthode de TA ER VM7Luc est conçue comme un outil de l'analyse du poids de la preuve pour contribuer à établir quelles substances tester en priorité à l'aide d'essais *in vivo* de l'effet perturbateur sur le système endocrinien. Cette procédure de priorisation comprend notamment la classification du produit chimique d'essai comme positif ou négatif pour son activité agoniste et antagoniste sur les ER. Les critères d'interprétation des résultats positifs et négatifs appliqués dans l'étude de validation de la méthode de TA ER VM7Luc sont décrits dans le tableau 1.

Tableau 1

Critères d'interprétation des résultats positifs et négatifs

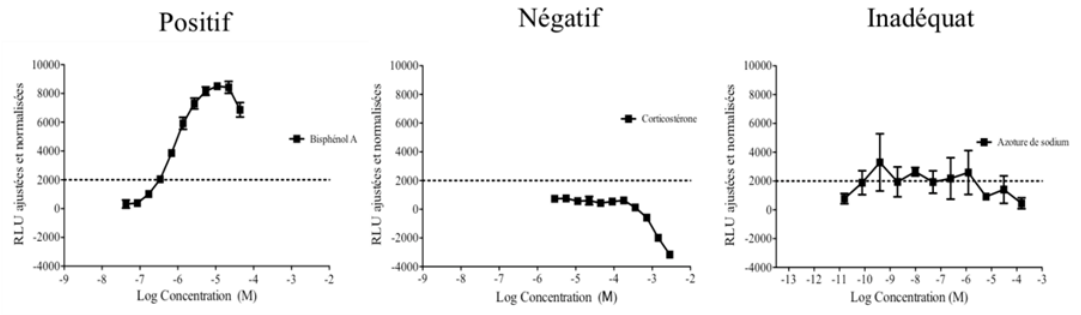
ACTIVITÉ AGONISTE	
Positif	— Les produits chimiques d'essai classés *positifs* pour leur activité agoniste sur les ER présentent toutes une courbe concentration-réponse constituée d'une base, puis d'une droite de pente croissante et enfin d'un plateau ou d'un sommet. Il arrive que seules deux de ces caractéristiques (base-pente ou pente-sommet) puissent être définies. — La droite de pente positive comporte au moins trois points dont les barres d'erreur (moyenne ± écart-type) ne se chevauchent pas. Les points formant la ligne de base sont exclus, mais le sommet ou le premier point du plateau peuvent être compris dans la partie linéaire de la courbe. — Pour être classé positif, il convient que le produit chimique induise une réponse dont l'amplitude, c'est-à-dire la différence entre la base et le sommet, est supérieure ou égale à 20 % de la réponse maximale provoquée par l'étalon de référence E2 (soit au moins 2 000 RLU si la valeur maximale induite par l'étalon de référence [E2] est ajustée à 10 000 RLU). — Dans la mesure du possible, on calcule la CE_{50} de chaque produit chimique positif.
Négatif	Les RLU moyennes ajustées obtenues pour une concentration donnée sont inférieures ou égales à la moyenne des RLU du témoin DMSO plus trois fois son écart-type.
Inadéquat	Les données jugées invalides pour l'établissement d'une activité éventuelle en raison de limites qualitatives ou quantitatives importantes sont considérées comme inadéquates et ne peuvent pas servir à déterminer si un produit chimique d'essai est positif ou négatif. Il convient alors de tester à nouveau le produit chimique d'essai.
ACTIVITÉ ANTAGONISTE	
Positif	— La courbe concentration-réponse du produit chimique d'essai est constituée d'une base suivie d'une droite décroissante. — La droite de pente négative comporte au moins trois points dont les barres d'erreur ne se chevauchent pas. Les points formant la ligne de base sont exclus, mais le premier point du plateau peut être compris dans la partie linéaire de la courbe. — On observe une baisse d'activité d'au moins 20 % de la réponse maximale obtenue avec l'étalon de référence Ral/E2 (soit 8 000 RLU ou moins si la réponse maximale de l'étalon de référence [Ral/E2] est ajustée à 10 000 RLU). — Les concentrations maximales non cytotoxiques du produit chimique d'essai sont inférieures ou égales à 1×10^{-5} M. — Dans la mesure du possible, on calcule la CI_{50} de chaque produit chimique d'essai positif.
Négatif	Toutes les réponses relevées sont supérieures à la CE_{80} (80 % de la réponse de E2, soit 8 000 RLU) pour les concentrations inférieures à $1{,}0 \times 10^{-5}$ M.
Inadéquat	Les données jugées non valides pour l'établissement d'une activité éventuelle en raison de limites qualitatives ou quantitatives importantes sont considérées comme inadéquates et ne peuvent pas servir à déterminer si un produit chimique d'essai est positif ou négatif. Il convient alors de tester à nouveau le produit chimique d'essai.

▼**M8**

40. Les résultats positifs sont caractérisés à la fois par l'amplitude de l'effet induit et par la concentration correspondant à cet effet, dans la mesure du possible. Des exemples de résultats positifs, négatifs et inadéquats sont présentés dans les graphiques 5 et 6.

Graphique 5

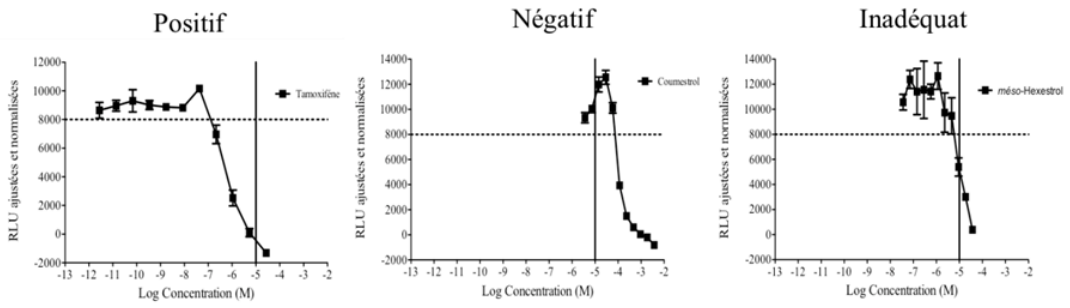
Exemples de résultats positifs, négatifs et inadéquats pour l'effet agoniste



Les lignes horizontales en pointillés indiquent 20 % de la réponse de E2, soit 2 000 RLU (valeur ajustée et normalisée).

Graphique 6

Exemples de résultats positifs, négatifs et inadéquats pour l'effet antagoniste



Les lignes horizontales en pointillés indiquent 80 % de la réponse du mélange Ral/E2, soit 8 000 RLU (valeur ajustée et normalisée).

Les lignes verticales pleines correspondent à 1,00 x 10^{-5} M. Une réponse est considérée comme positive quand elle est située en dessous de la barre des 8 000 RLU et à des concentrations inférieures à 1,00 x 10^{-5} M.

Les concentrations indiquées par un astérisque dans le graphique du méso-hexestrol ont donné lieu à un score de viabilité d'au moins 2.

Les résultats de l'essai du méso-hexestrol sont jugés inadéquats car la seule réponse inférieure à 8 000 RLU correspond à une concentration de 1,00 x 10^{-5} M.

41. On peut faire appel à la fonction de Hill à quatre paramètres pour calculer la CE_{50} et la CI_{50} [voir les protocoles pour les effets agoniste et antagoniste (7) pour plus de détails]. Le respect des critères d'acceptabilité indique que le système d'essai fonctionne correctement, mais ne garantit pas que chaque épreuve fournisse des données exactes. Dupliquer les résultats de la première épreuve constitue la meilleure garantie que les données obtenues sont correctes (voir le paragraphe 19 de la section «ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE TA ER»).

▼**M8**

RAPPORT D'ESSAI

42. Voir le paragraphe 20 de la section«ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE TA ER».

BIBLIOGRAPHIE

(1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, J. Cell Biochem., 82(3): 467-479.

(3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer Res., 58(23): 5 367-5 373.

(4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β, a Modulator of ERα in the Uterus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(11): 936-5 941.

(5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23(Suppl): p. 270-273.

(6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: p. 261-287.

(7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7 850.

(8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals*, In Vitro* Mol. *Toxicol*.,13(1):67-82.

(9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. *Pharmacol*., 71(10):1 459-69.

(10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology,17(6):646-57.

(11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology,139(10):4 252-63.

(12) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(13) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(14) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(15) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors:development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenicand anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

▼**M8**

Appendice 4

ESSAI DE TRANSACTIVATION FAISANT INTERVENIR LE RÉCEPTEUR DES ŒSTROGÈNES ALPHA HUMAIN TRANSFECTÉ DE FAÇON STABLE POUR LA DÉTECTION DE L'ACTIVITÉ ŒSTROGÉNIQUE AGONISTE ET ANTAGONISTE DES PRODUITS CHIMIQUES À L'AIDE DE LA LIGNÉE CELLULAIRE ERA CALUX

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES (VOIR AUSSI L'INTRODUCTION GÉNÉRALE)

1. L'essai de transactivation faisant intervenir la lignée cellulaire ERα CALUX s'appuie sur la lignée cellulaire humaine U2OS pour identifier les produits chimiques présentant une activité œstrogénique agoniste médiée par le récepteur des œstrogènes alpha humain (hERα). L'étude de validation de l'essai faisant intervenir la lignée cellulaire ERα CALUX transfectée de façon stable effectuée par *BioDetection Systems BV* (Amsterdam, Pays-Bas) a démontré la pertinence et la fiabilité de l'essai aux fins prévues (1). La lignée cellulaire ERα CALUX exprime uniquement le récepteur des œstrogènes ERα humain transfecté de façon stable (2) (3).

2. Cet essai est conçu spécifiquement pour détecter la transactivation médiée par hERα avec la bioluminescence comme paramètre de mesure. La bioluminescence est utilisée couramment dans les essais en raison de son rapport signal/bruit élevé (4).

3. Des concentrations de phytœstrogènes supérieures à 1 μM ont été rapportées comme entraînant une suractivation du gène rapporteur luciférase, induisant des signaux de luminescence non médiés par le récepteur (5) (6) (7). Par conséquent, des concentrations plus élevées de phytœstrogènes ou d'autres composés similaires qui peuvent suractiver l'expression de la luciférase doivent être examinées attentivement dans les essais de transactivation faisant intervenir le récepteur des œstrogènes transfecté de façon stable (voir appendice 2).

4. Il convient de consulter les sections «INTRODUCTION GENERALE» et «ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE LA TA ER» avant de mettre en œuvre le présent essai à des fins réglementaires. Les définitions et abréviations utilisées dans cette méthode d'essai sont indiquées à l'appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI (Voir aussi l'INTRODUCTION GÉNÉRALE)

5. Cet essai sert à indiquer la formation d'une liaison entre ER et ligand et la translocation ultérieure du complexe récepteur-ligand ainsi formé vers le noyau. Dans le noyau, le complexe récepteur-ligand se fixe à certains éléments de réponse de l'ADN et transactive un gène rapporteur luciférase de luciole, induisant une augmentation de l'expression cellulaire de l'enzyme luciférase. Après ajout, le substrat de la luciférase (luciférine) se transforme en un produit bioluminescent. La lumière produite est facilement détectable et quantifiable à l'aide d'un luminomètre.

6. Ce système d'essai utilise des cellules ERα CALUX transfectées de façon stable. Les cellules ERα CALUX proviennent de la lignée de cellules humaines U2OS ostéoblastiques d'ostéosarcome. Les cellules humaines U2OS ont été transfectées de manière stable avec 3xHRE-TATA-Luc et pSG5-neo-hERα à l'aide du procédé de co-précipitation par adjonction de phosphate de calcium. La lignée cellulaire U2OS a été considérée comme le meilleur candidat et donc choisie pour servir de lignée cellulaire rapporteur sensible aux œstrogènes (et à d'autres hormones stéroïdiennes) car elle présente une activité faible voire nulle du récepteur endogène. L'absence de récepteur endogène a été évaluée en utilisant uniquement des plasmides rapporteurs de la luciférase qui n'ont pas présenté d'activité lors de l'ajout du récepteur-ligand. En outre, cette lignée cellulaire soutenait de fortes réponses à médiation hormonale lors de l'introduction transitoire de récepteurs apparentés (2) (3) (8).

7. L'essai de produits chimiques pour la détection de l'activité œstrogénique ou anti-œstrogénique à l'aide de la lignée cellulaire ERα CALUX comprend une épreuve de présélection et des épreuves complètes. Pendant l'épreuve de présélection, la solubilité, la cytotoxicité et une gamme de concentrations

▼M8

affinée des produits chimiques d'essai aux fins d'essais complets sont déterminées. Pendant les épreuves complètes, les gammes de concentrations affinées de produits chimiques sont testées dans l'essai faisant intervenir la lignée cellulaire ERα CALUX; ensuite, la classification des produits chimiques d'essai est établie pour leur activité agoniste ou antagoniste.

8. Les critères d'interprétation des résultats sont décrits en détail au paragraphe 59. En résumé, un produit chimique d'essai est considéré comme positif pour l'activité agoniste si au moins deux concentrations consécutives de ce produit provoquent une réponse supérieure ou égale à 10 % de la réponse maximale de l'étalon de référence 17β-œstradiol (TP_{10}). Un produit chimique d'essai est considéré comme positif pour l'activité antagoniste si au moins deux concentrations consécutives de ce produit provoquent une réponse inférieure ou égale à 80 % de la réponse maximale de l'étalon de référence tamoxifène (TP_{80}).

PROCÉDURE

Lignées cellulaires

9. La lignée cellulaire U2OS ERα CALUX transfectée de façon stable est utilisée dans cet essai. Cette lignée peut être obtenue auprès de *BioDetection Systems BV* (Amsterdam, Pays-Bas) sous accord de licence technique.

10. Seules des cultures de cellules exemptes de mycoplasme sont utilisées. Les lots de cellules utilisés sont certifiés négatifs en ce qui concerne la contamination par des mycoplasmes, ou bien un test de détection des mycoplasmes est effectué avant utilisation. La RT-TPR (réaction en chaîne par polymérase en temps réel) est utilisée pour une détection sensible des infections à mycoplasmes (9).

Stabilité de la lignée cellulaire

11. Afin de préserver leur stabilité et leur intégrité, il convient de stocker les cellules CALUX dans de l'azote liquide (-80^{0}C). Après décongélation de cellules pour lancer une nouvelle culture, les cellules sont mises en culture secondaire au moins deux fois avant d'être utilisées pour l'évaluation de l'activité œstrogénique agoniste et antagoniste des produits chimiques. Les cellules ne sont plus cultivées au-delà de 30 passages.

12. Pour contrôler la stabilité de la lignée cellulaire au fil du temps, la réactivité du système d'essai agoniste et antagoniste est vérifiée par l'évaluation de la CE_{50} ou de la CI_{50} de l'étalon de référence. De plus, l'induction relative de l'échantillon témoin positif (TP) et de l'échantillon témoin négatif (TN) est contrôlée. Les résultats doivent répondre aux critères d'acceptation de l'essai ERα CALUX en ce qui concerne l'activité agoniste (tableau 3C) et l'activité antagoniste (tableau 4C). Les étalons de référence, les témoins positifs et les témoins négatifs figurent dans les tableaux 1 (activité agoniste) et 2 (activité antagoniste).

Conditions de dépôt et de culture des cellules

13. Les cellules U2OS sont cultivées dans un milieu de culture [milieu DMEM/F12 (1:1) avec rouge de phénol comme indicateur de pH, complété par sérum bovin fœtal (7.5 %), acides aminés non essentiels (1 %), 10 unités/ml de pénicilline, streptomycine et généticine (G-418) comme marqueur de sélection]. Les cellules sont placées dans un incubateur de CO_2 (5 % de CO_2) à 37^{0}C et à 100 % d'humidité. Lorsque les cellules atteignent 85-95 % de la confluence, elles sont soit mises en culture secondaire soit préparées pour l'ensemencement dans des plaques microtitres 96 puits. Dans le deuxième cas de figure, les cellules sont remises en suspension à la concentration de 1x10^{5}cellules/ml dans le milieu d'essai exempt d'œstrogènes [milieu DMEM/F12 (1:1) sans rouge de phénol, complété par sérum bovin fœtal traité au charbon enrobé de dextrane (5 % v/v), acides aminés non essentiels (1 % v/v), 10 unités/ml de pénicilline et streptomycine] et cultivées dans les puits des plaques microtitres 96 puits (100 µl de suspension cellulaire homogénéisée). Les cellules sont ensuite pré-incubées dans un incubateur de CO_2 (5 % de CO_2, 37^{0}C, 100 % d'humidité) pendant 24 heures avant l'exposition. Le matériel en plastique est exempt d'œstrogènes.

▼M8

Critères d'acceptabilité

14. Les activités agoniste et antagoniste du/des produit(s) chimique(s) d'essai sont testées en série. Une série d'essais est composée de six plaques microtitres au maximum. Chaque série d'essais contient au moins une série complète de dilutions d'un étalon de référence, d'un échantillon témoin positif, d'un échantillon témoin négatif et de témoins contenant le solvant. Les figures 1 et 2 illustrent l'agencement de la plaque pour la série d'essais agonistes et antagonistes.

15. Chaque dilution des étalons de référence, produits chimiques d'essai, témoins contenant le solvant, témoins positifs et témoins négatifs font l'objet d'analyses tripliquées. Chacune de ces analyses doit satisfaire aux exigences énoncées dans les tableaux 3A et 4A.

16. Une série complète de dilutions de l'étalon de référence (17β-œstradiol pour l'activité agoniste; tamoxifène pour l'activité antagoniste) est mesurée sur la première plaque dans chaque série d'essais. Aux fins de comparaison des résultats d'analyse des cinq autres plaques microtitres avec ceux de la première plaque microtitre contenant la courbe concentration-réponse complète de l'étalon de référence, toutes les plaques contiennent trois échantillons témoins: le témoin contenant le solvant, la plus forte concentration de l'étalon de référence testé et la CE_{50} (activité agoniste) ou CI_{50} (activité antagoniste) approximative de l'étalon de référence. Le ratio des échantillons témoins moyens de la première plaque et des cinq autres plaques doit satisfaire aux exigences énoncées dans le tableau 3C (activité agoniste) ou le tableau 4C (activité antagoniste).

17. Pour chacune des plaques microtitres d'une série d'essais, le facteur z est calculé (10). Le facteur z doit être calculé en utilisant les réponses à la plus haute et à la plus basse concentration de l'étalon de référence Une plaque microtitre est considérée comme valide si elle satisfait aux exigences énoncées dans le tableau 3C (activité agoniste) ou le tableau 4C (activité antagoniste).

18. L'étalon de référence doit donner lieu à une courbe dose-réponse de forme sigmoïde. La CE_{50} ou CI_{50} dérivée de la réponse de la série de dilutions de l'étalon de référence doit satisfaire aux exigences énoncées dans le tableau 3C (activité agoniste) ou le tableau 4C (activité antagoniste).

19. Chaque série d'essais est composée d'un échantillon témoin positif et d'un échantillon témoin négatif. L'induction relative calculée à la fois sur la base de l'échantillon témoin positif et de l'échantillon témoin négatif doit répondre aux exigences énoncées dans le tableau 3C (activité agoniste) ou le tableau 4C (activité antagoniste).

20. Pendant toute la durée des mesures, le facteur d'induction de la plus forte concentration de l'étalon de référence est mesuré en divisant la plus forte réponse moyenne de l'étalon de référence 17β-œstradiol obtenue en unités relatives de lumière (URL) par la réponse moyenne du témoin contenant le solvant obtenue en URL. Ce facteur d'induction doit satisfaire aux exigences minimales relatives au facteur multiplicatif de l'augmentation de l'induction énoncées dans le tableau 3C (activité agoniste) et le tableau 4C (activité antagoniste)..

21. Seules les plaques microtitres qui remplissent tous les critères d'acceptation susmentionnés sont considérées comme valides et peuvent être utilisées pour évaluer la réponse des produits chimiques d'essai.

22. Les critères d'acceptation sont applicables à la fois à l'épreuve de présélection et aux épreuves complètes.

▼M8

Tableau 1

Concentrations de l'étalon de référence, du témoin positif (TP) et du témoin négatif (TN) pour l'essai CALUX de détection de l'activité agoniste

	Produit chimique	N° CAS	Plage d'essai (M)
Étalon de référence	17β-œstradiol	50-28-2	$1*10^{-13}$ – $1*10^{-10}$
Témoin positif (TP)	17α-méthyltestostérone	58-18-4	$3*10^{-6}$
Témoin négatif (TN)	corticostérone	50-22-6	$1*10^{-8}$

Tableau 2

Concentrations de l'étalon de référence, du témoin positif (TP) et du témoin négatif (TN) pour l'essai CALUX de détection de l'activité antagoniste

	Produit chimique	N° CAS	Plage d'essai (M)
Étalon de référence	tamoxifène	10540-29-1	$3*10^{-9}$ – $1*10^{-5}$
Témoin positif (TP)	4-hydroxytamoxifène	68047-06-3	$1*10^{-9}$
Témoin négatif (TN)	resvératrol	501-36-0	$1*10^{-5}$

Tableau 3

Critères d'acceptation pour l'essai ERα CALUX de détection de l'activité agoniste

A – échantillons individuels sur une plaque		Critère
1	% maximum des ET des puits tripliqués (pour TN, TP, chaque dilution du produit chimique d'essai, l'étalon de référence, à l'exception de C0)	< 15 %
2	% maximum des ET des puits tripliqués (pour l'étalon de référence et témoins contenant le solvant du produit chimique d'essai (C0, CS)	< 30 %
3	Perte maximale de LDH, comme mesure de la cytotoxicité	< 120 %
B – pour une seule plaque microtitre		
4	Ratio du témoin contenant le solvant de l'étalon de référence (C0; plaque 1) et du témoin contenant le solvant du produit chimique d'essai (CS; plaques de 2 à x)	0,5 to 2,0
5	Ratio du témoin contenant le solvant de l'étalon de référence (C0; plaque 1) et du témoin contenant le solvant du produit chimique d'essai (CS; plaques de 2 à x)	0,70 to 1,30
6	Facteur z pour chaque plaque	>0,6
C – pour une seule série d'analyses (toutes les plaques appartenant à une même série)		
7	Courbe sigmoïde de l'étalon de référence	Oui (17ß-estradiol)
8	Gamme de CE_{50} de l'étalon de référence 17ß-œstradiol	$4*10^{-12}$ – $4*10^{-11}$ M
9	Facteur multiplicatif minimum de l'augmentation de l'induction de la plus forte concentration de 17ß-œstradiol, par rapport au témoin contenant le solvant de l'étalon de référence.	5
10	Induction relative (%) TP	> 30 %
11	Induction relative (%) TN	<10 %

▼M8

Appr.: approximative; TP: témoin positif; TN: témoin négatif; ET: écart-type; CS: témoin contenant le solvant du produit chimique d'essai; C0: témoin contenant le solvant de l'étalon de référence; LDH: lactate déshydrogénase

Tableau 4

Critères d'acceptation pour l'essai ERα CALUX de détection de l'activité antagoniste

A - individual samples on a plate		**Criterium**
1	% maximum des ET des puits tripliqués (pour TN, TP, chaque dilution du produit chimique d'essai, l'étalon de référence, témoin contenant le solvant (C0))	< 15 %
2	% maximum des ET des puits tripliqués (pour témoin contenant le véhicule (TV) et concentration la plus forte de l'étalon de référence (C8)	< 30 %
3	Perte maximale de LDH, comme mesure de la cytotoxicité	< 120 %
B - pour une seule plaque microtitre		
4	Ratio du témoin contenant le solvant de l'étalon de référence (C0; plaque 1) et du témoin contenant le solvant du produit chimique d'essai (CS; plaques de 2 à x)	0,70 to 1,30
5	Ratio des CI_{50} appr. de l'étalon de référence sur la plaque 1 et des CI_{50} appr. de l'étalon de référence sur les plaques de 2 à x (C4)	0,70 to 1,30
6	Ratio des plus fortes concentrations de l'étalon de référence sur la plaque 1 et des plus fortes concentrations de l'étalon de référence sur les plaques de 2 à x(C8)	0,50 to 2,0
7	Facteur z pour chaque plaque	>0,6
C - pour une seule série d'analyses (toutes les plaques appartenant à une même série)		
8	Courbe sigmoïde de l'étalon de référence	Oui (Tamoxifène)
9	Gamme de CI_{50} de l'étalon de référence (tamoxifène)	1*10-8 - 1*10-7 M
10	Facteur multiplicatif minimum de l'augmentation de l'induction du témoin contenant le solvant de l'étalon de référence, par rapport à la plus forte concentration de tamoxifène	2,5
11	Induction relative (%) TP	<70 %
12	Induction relative (%) TN	>85 %

Appr.: approximative; TP: témoin positif; TN: témoin négatif; ET: écart-type; TV: témoin contenant le véhicule; CS: témoin contenant le solvant du produit chimique d'essai; C0: témoin contenant le solvant de l'étalon de référence; LDH: lactate déshydrogénase

Témoin contenant le véhicule/solvant, étalons de référence, témoins positifs, témoins négatifs

23. Les témoins contenant le véhicule/solvant, étalons de référence, témoins positifs et témoins négatifs utilisés sont identiques pour l'épreuve de présélection et les épreuves complètes. De plus, la concentration des étalons de référence, des témoins positifs et des témoins négatifs est identique.

▼**M8**

Témoin contenant le solvant

24. Le solvant utilisé pour dissoudre les produits chimiques d'essai est testé en tant que témoin contenant le solvant. Le diméthylsulfoxyde (DMSO, 1 % (v/v); CASRN 67-68-5) a été utilisé comme véhicule lors de la validation de l'essai ERα CALUX. Si l'on fait appel à un autre solvant que le DMSO, l'ensemble des étalons de référence, des témoins et des produits chimiques est testé dans le même véhicule. Il convient de noter que, pour les études d'activité antagoniste, le témoin contenant le solvant contient une concentration fixe de l'étalon de référence agoniste, le 17β-œstradiol (environ la concentration CE_{50}). Pour tester le solvant utilisé pour les études d'activité antagoniste, un témoin contenant le véhicule est préparé et testé.

Témoin contenant le véhicule (antagonisme)

25. Pour les études d'activité antagoniste, le milieu d'essai est supplémenté avec une concentration fixe de l'étalon de référence agoniste, le 17β-œstradiol (environ la concentration CE_{50}). Pour tester le solvant utilisé pour dissoudre les produits chimiques d'essai pour l'activité antagoniste, il convient de préparer un milieu d'essai ne contenant pas de concentration fixe de l'étalon de référence agoniste (17β-œstradiol). Cet échantillon témoin correspond au témoin contenant le véhicule. Le diméthylsulfoxyde (DMSO, 1 % (v/v); CASRN 67-68-5) a été utilisé comme véhicule lors de la validation de l'essai ERα CALUX. Si l'on fait appel à un autre solvant que le DMSO, l'ensemble des étalons de référence, des témoins et des produits chimiques est testé dans le même véhicule.

Étalons de référence

26. L'étalon de référence utilisé dans l'essai de détection de l'activité agoniste est le 17β-œstradiol (tableau 1). Les étalons de référence comprennent une série de dilutions de huit concentrations de 17β-œstradiol ($1*10^{-13}$, $3*10^{-13}$, $1*10^{-12}$, $3*10^{-12}$, $6*10^{-12}$, $1*10^{-11}$, $3*10^{-11}$, $1*10^{-10}$ M).

27. L'étalon de référence utilisé dans l'essai de détection de l'activité antagoniste est le tamoxifène (tableau 2). Les étalons de référence comprennent une série de dilutions de huit concentrations de tamoxifène ($3*10^{-9}$, $1*10^{-8}$, $3*10^{-8}$, $1*10^{-7}$, $3*10^{-7}$, $1*10^{-6}$, $3*10^{-6}$, $1*10^{-5}$ M). Chacune des concentrations de l'étalon de référence antagoniste est co-incubée avec une concentration fixe de l'étalon de référence agoniste 17β-œstradiol ($3*10^{-12}$ M).

Témoin positif

28. Le témoin positif pour les études d'activité agoniste est la 17α-méthyltestostérone (tableau 1).

29. Le témoin positif pour les études d'activité antagoniste est le 4-hydroxytamoxifène (tableau 2). Le témoin positif antagoniste est co-incubé avec une concentration fixe de l'étalon de référence agoniste 17β-œstradiol ($3*10^{-12}$ M).

Témoin négatif

30. Le témoin négatif pour les études d'activité agoniste est la corticostérone (tableau 1).

31. Le témoin négatif pour les études d'activité antagoniste est le resvératrol (tableau 2). Le témoin négatif antagoniste est co-incubé avec une concentration fixe de l'étalon de référence agoniste 17β-œstradiol ($3*10^{-12}$ M).

▼M8

Démonstration de la compétence du laboratoire (voir paragraphe 14 et tableaux 3 et 4 de la rubrique «ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE TA ER» de la présente méthode d'essai).

Véhicule

32. Le solvant utilisé pour dissoudre les produits chimiques d'essai solubilise complètement les produits testés, et est miscible avec le milieu cellulaire. Le DMSO, l'eau et l'éthanol (de 95 % à 100 % de pureté) sont des solvants appropriés. Si le DMSO est utilisé comme solvant, la concentration maximale de DMSO pendant l'incubation ne doit pas dépasser 1 % (v/v). Avant utilisation, le solvant est testé pour vérifier l'absence de cytotoxicité et d'interférences avec la performance des essais.

Préparation des étalons de référence, des témoins positifs, des témoins négatifs et des produits chimiques

33. Les étalons de référence, témoins positifs, témoins négatifs et produits chimiques sont dissous dans 100 % de DMSO (ou tout autre solvant approprié). Des dilutions (en série) appropriées sont ensuite préparées dans ce même solvant. Avant leur dissolution, l'ensemble des substances est amené à température ambiante. Les solutions-mères fraîchement préparées d'étalons de référence, de témoins positifs, de témoins négatifs et de produits chimiques d'essai ne doivent pas présenter de précipité ni de turbidité notables. Des solutions-mères d'étalons de référence et de témoins peuvent être préparées à l'avance. Des solutions-mères du produit chimique d'essai sont préparées extemporanément pour chaque expérience. Des dilutions finales des étalons de référence, témoins positifs et négatifs et produits chimiques sont préparées extemporanément pour chaque expérience et utilisées dans les 24 heures.

Solubilité, cytotoxicité et détermination de l'ordre de grandeur

34. Pendant l'épreuve de présélection, la solubilité des produits chimiques d'essai dans le solvant choisi est déterminée. Une solution-mère d'une concentration maximale de 0,1 M est préparée. Si cette concentration révèle des problèmes de solubilité, des solutions-mères de concentration inférieure sont préparées jusqu'à dissolution complète des produits chimiques d'essai. Pendant l'épreuve de présélection, des dilutions successives à 1:10 du produit chimique d'essai sont testées. La concentration maximale pour les essais agoniste et antagoniste est de 1 mM. À l'issue de l'épreuve de présélection, une gamme appropriée de concentrations affinées de produits chimiques est déduite et testée pendant les épreuves complètes. Les dilutions utilisées pour les épreuves complètes sont les suivantes: 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x et 3000x.

35. Des essais de cytotoxicité sont menés dans le cadre du protocole de l'essai agoniste et antagoniste (11). Ces essais de cytotoxicité sont menés à la fois durant l'épreuve de présélection et les épreuves complètes. La méthode utilisée pour évaluer la cytotoxicité lors de la validation de l'essai ERα CALUX combine l'essai de perte de lactate déshydrogénase (LDH) et l'inspection visuelle qualitative des cellules (voir appendice 4.1) après exposition aux produits chimiques d'essai. Cependant, il est possible d'avoir recours à d'autres méthodes quantitatives de détermination de la cytotoxicité (test colorimétrique au sel de tétrazolium MTT ou essai CALUX de cytotoxicité, par exemple). En général, les concentrations de produits chimiques induisant une réduction de plus de 20 % de la viabilité cellulaire sont considérées comme cytotoxiques et ne peuvent donc pas être utilisées pour l'évaluation des données. En ce qui concerne l'essai de perte de LDH, la concentration du produit chimique d'essai est considérée comme cytotoxique si la perte de LDH est supérieure à 120 %.

▼M8

Exposition aux produits chimiques d'essai et organisation de la plaque d'essai

36. Après trypsinisation d'une fiole de cellules confluentes mises en culture, les cellules sont remises en suspension à la concentration de $1x10^5$ cellules/ml dans le milieu d'essai exempt d'œstrogènes. Cent µl de cellules remises en suspension sont placées dans les puits intérieurs d'une plaque microtitre 96 puits. Les puits extérieurs sont remplis avec 200 µl de tampon phosphate salin (PBS) (voir figures 1 et 2). Les cellules des puits intérieurs sont ensuite pré-incubées dans un incubateur à CO_2 (5 % de CO_2, 37°C, 100 % d'humidité) pendant 24 heures.

37. Après pré-incubation, les plaques font l'objet d'une inspection visuelle visant à détecter la cytotoxicité (voir appendice 4.1), la contamination et la confluence. Seules les plaques sans cytotoxicité ni contamination visibles et avec une confluence d'au moins 85 % sont utilisées pour les essais. Le milieu des puits intérieurs est soigneusement retiré et remplacé par 200 µl de milieu d'essai exempt d'œstrogènes contenant une série de dilutions appropriées de l'étalon de référence, du produit chimique d'essai, du témoin positif, du témoin négatif et du témoin contenant lesolvant (tableau 5: études de l'activité agoniste; tableau 6: études de l'activité antagoniste). Tous les étalons de référence, produits chimiques d'essai, témoins positifs, témoins négatifs et témoins contenant le solvant sont tripliqués. La figure 1 illustre l'agencement des plaques pour les essais agonistes. La figure 2 illustre l'agencement des plaques pour les essais antagonistes. L'agencement des plaques est identique pour l'épreuve de présélection et les épreuves complètes. Pour les essais antagonistes, tous les puits intérieurs, sauf ceux du témoin contenant le véhicule (TV), contiennent également une concentration fixe de l'étalon de référence agoniste 17β-œstradiol ($3*10^{-12}$ M). Notons que les étalons de référence C8 et C4 sont ajoutés à chaque plaque contenant le produit chimique d'essai.

38. Après exposition des cellules à tous les produits chimiques, les plaques microtitres 96 puits sont incubées de nouveau dans un incubateur à CO_2 (5 % de CO_2, 37°C, 100 % d'humidité) pendant 24 heures.

Figure 1

Agencement des plaques microtitres 96 puits pour l'épreuve de présélection et l'évaluation de l'effet agoniste

Plaque 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	TP	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	TP	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	TP	
E		TS	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TN	
F		TS	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TN	
G		TS	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TN	
H												

Plaques suivantes

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		TS	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		TS	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		TS	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		TS	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (CE50)	
F		TS	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (CE50)	
G		TS	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (CE50)	
H												

C0 = solvant de l'étalon de référence.

C(1-8) = série de dilutions (1-8, concentrations faibles à élevées) de l'étalon de référence.

▼**M8**

TP = témoin positif.

TN = témoin négatif.

TCx-(1-8) = dilutions (1-8, concentrations faibles à élevées) du produit chimique d'essai pour l'épreuve de présélection et l'évaluation de l'effet agoniste du produit chimique d'essai x.

TS = témoin contenant le solvant du produit chimique d'essai (de préférence le même solvant que C0, mais provenant éventuellement d'un autre lot).

Cellules grisées = puits externes, remplis de 200µl de PBS.

Figure 2

Agencement des plaques microtitres 96 puits pour l'épreuve de présélection et l'évaluation de l'effet antagoniste

Plaque 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	TV	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	TV	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	TV	
E		TN	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TP	
F		TN	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TP	
G		TN	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TP	
H												

Plaques suivantes

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		TS	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		TS	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		TS	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (CI50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (CI50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (CI50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = reference standard solvent.

C(1-8) = series of dilutions (1-8, low-to-high concentrations) of reference standard.

NC = Négative control.

PC = Positive control.

TCx-(1-8) = dilutions (1-8, low-to-high concentrations) of test chemical for the prescreen run and assessment of agonistic effect of test chemical x.

TS = témoin contenant le solvant du produit chimique d'essai (de préférence le même solvant que C0, mais provenant éventuellement d'un autre lot)..

TV = témoin contenant le véhicule (témoin contenant le solvant mais ne contenant pas de concentration fixe de l'étalon de référence agoniste - 17β-œstradiol)..

Cellules grisées: = puits externes, remplis de 200µl de PBS..

Note: Tous les puits intérieurs, sauf ceux du témoin contenant le véhicule (TV), contiennent également une concentration fixe de l'étalon de référence agoniste 17β-œstradiol ($3{,}0*10^{-12}$ M)/.

Mesure de la luminescence

39. La mesure de luminescence est décrite en détail dans le protocole de l'essai agoniste et antagoniste (10). Le milieu des puits est retiré, et les cellules sont lysées après 24 heures d'incubation pour ouvrir la membrane cellulaire et permettre la mesure de l'activité de la luciférase.

▼**M8**

40. La procédure de mesure de la luminescence nécessite un luminomètre à deux injecteurs. La réaction de la luciférase est déclenchée par injection de la luciférine (substrat de la luciférase). Cette même réaction est arrêtée par ajout de 0,2 M NaOH, afin d'empêcher le report de luminescence d'un puits à l'autre.

41. La lumière émise par chaque puits est exprimée en unités relatives de lumière (URL) par puits.

Épreuve de présélection

42. Les résultats de l'analyse de présélection servent à déterminer une gamme de concentrations affinées de produits chimiques testées pour les essais complets. L'évaluation des résultats de l'analyse de présélection et la détermination des gammes de concentrations affinées de produits chimiques d'essai pour les essais complets sont décrites en détail dans le protocole de l'essai agoniste et antagoniste (10). Les paragraphes suivants résument succinctement les procédures de détermination des gammes de concentrations affinées de produits chimiques d'essai pour les essais agoniste et antagoniste. Les tableaux 5 et 6 donnent des orientations sur la conception des dilutions en série.

Sélection des concentrations pour l'évaluation des effets agonistes

43. Pendant l'épreuve de présélection, les produits chimiques sont testés en utilisant la série de dilutions indiquée dans les tableaux 5 (activité agoniste) et 6 (activité antagoniste). Toutes les concentrations sont testées dans des puits tripliqués suivant l'agencement des plaques indiqué dans les figures 1 (activité agoniste) et 2 (activité antagoniste).

44. Seuls les résultats d'analyse qui remplissent les critères d'acceptation (tableau 3) sont considérés comme valables et peuvent être utilisés pour évaluer la réponse des produits chimiques d'essai. Les plaques microtitres qui ne remplissent pas les critères d'acceptation sont analysées de nouveau. Si la première plaque contenant la série complète de dilutions de l'étalon de référence ne remplit pas les critères d'acceptation, la série complète d'essais (six plaques) fait l'objet d'une nouvelle analyse.

45. Les gammes de concentrations initiales de produits chimiques d'essai sont ajustées, et l'épreuve de présélection est répétée si:

— une cytotoxicité est observée. L'épreuve de présélection est répétée avec des concentrations du produit chimique d'essai plus faibles, non cytotoxiques;

— l'épreuve de présélection du produit chimique d'essai ne donne pas lieu à une courbe dose-réponse complète car les concentrations testées génèrent un niveau d'induction maximal. L'épreuve de présélection est répétée avec des concentrations plus faibles du produit chimique d'essai.

46. En cas d'observation d'une relation dose-réponse valide, la (plus faible) concentration à laquelle l'induction maximale est observée sans révéler de cytotoxicité est sélectionnée. La plus forte concentration du produit chimique à tester dans les épreuves complètes est trois fois supérieure à la concentration sélectionnée.

47. Une série affinée complète de dilutions du produit chimique est préparée suivant les étapes de dilution indiquées dans le tableau 5, en commençant par la plus forte concentration tel que susmentionné.

▼M8

48. Si un produit chimique ne provoque pas d'effets agonistes, il est testé dans les épreuves complètes en commençant par la plus forte concentration non cytotoxique identifiée durant l'épreuve de présélection.

Sélection des concentrations pour l'évaluation des effets antagonistes

49. Seuls les résultats d'analyse qui remplissent les critères d'acceptation (tableau 4) sont considérés comme valables et peuvent être utilisés pour évaluer la réponse des produits chimiques d'essai. Les plaques microtitres d'une série d'analyses qui ne remplissent pas les critères d'acceptation sont analysées de nouveau. Si la première plaque contenant la série complète de dilutions de l'étalon de référence ne remplit pas les critères d'acceptation, la série complète d'essais (six plaques) fait l'objet d'une nouvelle analyse.

50. Les gammes de concentrations initiales de produits chimiques d'essai sont ajustées, et l'épreuve de présélection est répétée si:

— une cytotoxicité est observée. L'épreuve de présélection est répétée avec des concentrations du produit chimique d'essai plus faibles, non cytotoxiques;

— l'épreuve de présélection du produit chimique d'essai ne donne pas lieu à une courbe dose-réponse complète car les concentrations testées génèrent un niveau d'inhibition maximal. L'épreuve de présélection est répétée avec des concentrations plus faibles du produit chimique d'essai.

51. En cas d'observation d'une relation dose-réponse valide, la (plus faible) concentration à laquelle l'inhibition maximale est observée sans révéler de cytotoxicité est sélectionnée. La plus forte concentration du produit chimique à tester dans les épreuves complètes est trois fois supérieure à la concentration sélectionnée.

52. Une série affinée complète de dilutions du produit chimique est préparée suivant les étapes de dilution indiquées dans le tableau 6, en commençant par la plus forte concentration tel que susmentionné.

53. Si un produit chimique ne provoque pas d'effets antagonistes, il est testé dans les épreuves complètes en commençant par la plus forte concentration non cytotoxique testée durant l'épreuve de présélection.

Épreuves complètes

54. À l'issue de la sélection des gammes de concentrations affinées, les produits chimiques sont testés de manière exhaustive en utilisant la série de dilutions indiquée dans les tableaux 5 (activité agoniste) et 6 (activité antagoniste). Toutes les concentrations sont testées dans des puits tripliqués selon l'agencement des plaques indiqué à la figure 1 (activité agoniste) et 2 (activité antagoniste).

55. Seuls les résultats d'analyse qui remplissent les critères d'acceptation (tableaux 3 et 4) sont considérés comme valables et peuvent être utilisés pour évaluer la réponse des produits chimiques d'essai. Les plaques microtitres qui ne remplissent pas les critères d'acceptation sont analysées de nouveau. Si la première plaque contenant la série complète de dilutions de l'étalon de référence ne remplit pas les critères d'acceptation, la série complète d'essais (six plaques) fait l'objet d'une nouvelle analyse.

▼**M8**

Tableau 5

Concentration et dilutions des étalons de référence, des témoins et des produits chimiques utilisés pour les essais agonistes

Conc. (M) de l'étalon de référence 17β-œstradiol		Dilution du TCx durant l'épreuve de présélection		Dilution du TCx durant l'épreuve complète		Conc. (M) des témoins	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	TP	$3*10^{-6}$
C1	$1*10^{-13}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	TN	$1*10^{-8}$
C2	$3*10^{-13}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$1*10^{-12}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	TS	0
C4	$3*10^{-12}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$6*10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1*10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3*10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1*10^{-10}$						

TCx - roduit chimique d'essai x
TP - témoin positif (17α-méthyltestostérone)
TN - témoin négatif (corticostérone)
C0 - témoin contenant le solvant de l'étalon de référence
TS - témoin contenant le solvant du produit chimique d'essai

▼**M8**

Tableau 6

Concentration et dilutions des étalons de référence, des témoins et des produits chimiques utilisés pour les essais antagonistes

Conc. (M) de l'étalon de référence tamoxifène		Dilution du TCx durant l'épreuve de présélection		Dilution du TCx durant les épreuves complètes		Conc. (M) des témoins	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	TP	$1*10^{-9}$
C1	$3*10^{-9}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	TN	$1*10^{-5}$
C2	$1*10^{-8}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3*10^{-8}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1*10^{-7}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3*10^{-7}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Conc. (M) de l'étalon de référence agoniste**	
C6	$1*10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3*10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-oestradiol	$3*10^{-12}$
C8	$1*10^{-5}$						

TCx - produit chimique d'essai x

TP - témoin positif (4-hydroxytamoxifène)

TN - témoin négatif (resvératrol)

C0 - témoin contenant le solvant de l'étalon de référence

TS - témoin contenant le solvant du produit chimique d'essaiTV - témoin contenant le véhicule [ne contient pas une concentration fixe de l'étalon de référence 17β-œstradiol utilisé pour la détection de l'activité agoniste (3,0*10-12 M)]

▼M8

Collecte et analyse des données

56. À l'issue de l'épreuve de présélection et des épreuves complètes, les valeurs CE_{10}, CE_{50}, TP_{10}, TP_{50} et l'induction maximale (TCx_{max}) d'un produit chimique sont déterminées pour les essais agonistes. Pour les essais antagonistes, les valeurs CI_{20}, CI_{50}, TP_{80}, TP_{50} et l'induction minimale (TCx_{min}) sont calculées. Les figures 3 (activité agoniste) et 4 (activité antagoniste) illustrent ces paramètres. Ces derniers sont calculés sur la base de l'induction relative de chaque produit chimique d'essai [par rapport à l'induction maximale de l'étalon de référence (=100 %)]. Une courbe de régression non linéaire (pente variable, quatre paramètres) est utilisée aux fins d'évaluation des données d'après l'équation ci-après:

$$Y = Base + \frac{(\text{Sommet} - \text{Base})}{(1 + 10^{(lgEC_{50} - X) \times Pente\ de\ Hill})}$$

X = Log de la dose ou concentration

Y = réponse (induction relative (%))

Sommet = induction maximale (%)

Base = induction minimale (%)

$LogCE_{50}$ = logarithme de la concentration correspondant à la réponse située à mi-chemin entre la base et le sommet

Pente de Hill = pente de la courbe

57. Les données brutes livrées par le luminomètre, exprimées en unités relatives de lumière (URL), sont transférées vers la feuille d'analyse des données conçue pour l'épreuve de présélection et les épreuves complètes. Les données brutes doivent remplir les critères d'acceptation des tableaux 3A, 3B (activité agoniste) et 4A, 4B (activité antagoniste). Si les données brutes remplissent les critères d'acceptation, les étapes de calculs ci-après sont effectuées en vue de la détermination des paramètres requis:

Activité agoniste

— Soustraire les URL moyennes du témoin contenant le solvant de l'étalon de référence des données brutes relatives aux étalons de référence.

— Soustraire les URL moyennes du témoin contenant le solvant du produit chimique d'essai des données brutes relatives aux produits chimiques d'essai.

— Calculer l'induction relative de chaque concentration de l'étalon de référence, 100 % correspondant à la concentration maximale de l'étalon de référence.

— Calculer l'induction relative de chaque concentration de produit chimique d'essai, 100 % correspondant à la concentration maximale de l'étalon de référence.

— Évaluer les résultats d'analyse suivant une courbe de régression non linéaire (pente variable, quatre paramètres).

▼**M8**

— Déterminer les valeurs CE_{50} et CE_{10} de l'étalon de référence.

— Déterminer les valeurs CE_{50} et CE_{10} des produits chimiques d'essai.

— Déterminer l'induction relative maximale du produit chimique d'essai (TC_{max}).

— Déterminer les valeurs TP10 et TP50 des produits chimiques d'essai.

En ce qui concerne les produits chimiques d'essai, il n'est pas toujours possible d'obtenir une courbe dose-réponse complète en raison de problèmes de cytotoxicité ou de solubilité, par exemple. En conséquence, les valeurs CE_{50}, CE_{10} et TP_{50} ne peuvent alors pas être déterminées. Dans ce cas, seules les valeurs TP_{10} et TC_{max} peuvent être déterminées.

Activité antagoniste

— Soustraire les URL moyennes de la concentration maximale d'étalon de référence des données brutes relatives aux étalons de référence.

— Soustraire les URL moyennes de la concentration maximale d'étalon de référence des données brutes relatives aux produits chimiques d'essai.

— Calculer l'induction relative de chaque concentration de l'étalon de référence, 100 % correspondant à la concentration maximale de l'étalon de référence.

— Calculer l'induction relative de chaque concentration de produit chimique d'essai, 100 % correspondant à la concentration maximale de l'étalon de référence.

— Évaluer les résultats d'analyse suivant une courbe de régression non linéaire (pente variable, quatre paramètres).

— Déterminer les valeurs CI_{50} et CI_{20} de l'étalon de référence.

— Déterminer les valeurs CI_{50} et CI_{20} des produits chimiques d'essai.

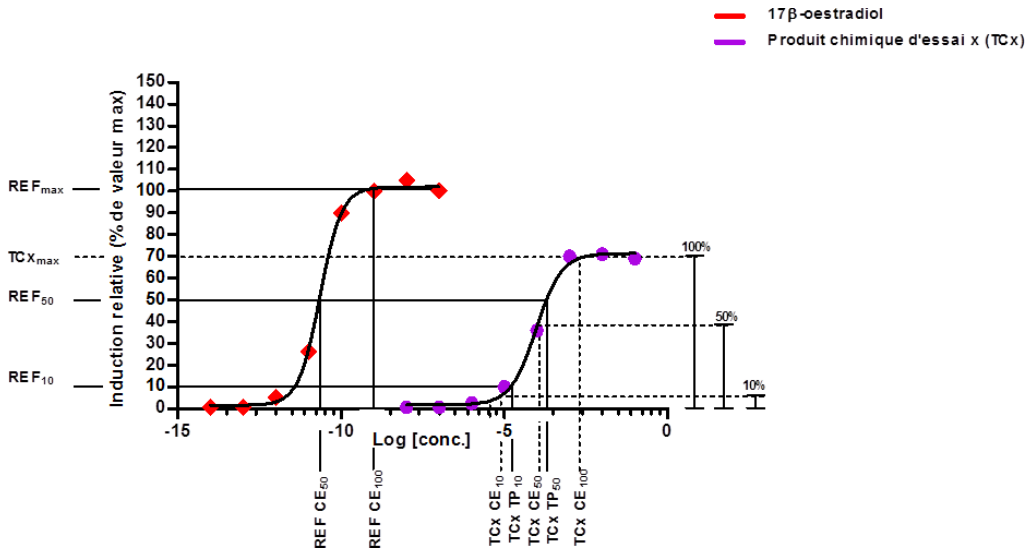
— Déterminer l'induction relative minimale du produit chimique d'essai (TC_{min}).

— Déterminer les valeurs TP_{80} et TP_{50} des produits chimiques d'essai.

▼M8

Figure 3

Vue d'ensemble des paramètres déterminés dans l'essai agoniste



CE_{10} = concentration de substance à laquelle 10 % de la réponse maximale est observée.

CE_{50} = concentration de substance à laquelle 50 % de la réponse maximale est observée.

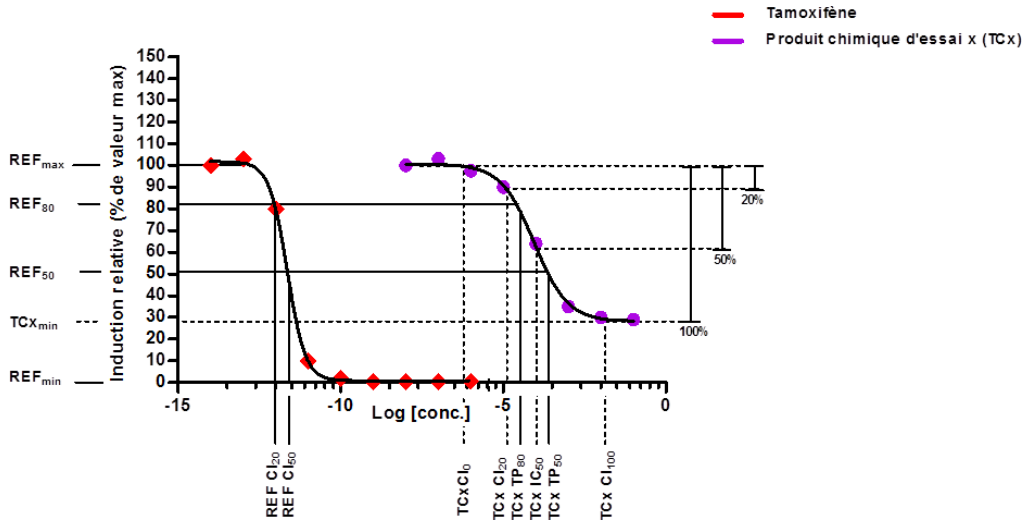
TP_{10} = concentration de produit chimique d'essai équivalant à la CE_{10} de l'étalon de référence.

TP_{50} = concentration de produit chimique d'essai équivalant à la CE_{50} de l'étalon de référence.

TCx_{max} = induction relative maximale du produit chimique d'essai.

Figure 4

Vue d'ensemble des paramètres déterminés dans l'essai antagoniste



CI_{20} = concentration de substance à laquelle 80 % de la réponse maximale est observée (20 % d'inhibition).

▼**M8**

CI_{50} = concentration de substance à laquelle 50 % de la réponse maximale est observée (50 % d'inhibition).

TP_{80} = concentration de produit chimique d'essai équivalant à la CI_{20} de l'étalon de référence.

TP_{50} = concentration de produit chimique d'essai équivalant à la CI_{50} de l'étalon de référence.

TCx_{min} = induction relative minimale du produit chimique d'essai.

En ce qui concerne les produits chimiques d'essai, il n'est pas toujours possible d'obtenir une courbe dose-réponse complète en raison de problèmes de cytotoxicité ou de solubilité, par exemple. En conséquence, les valeurs CI_{50}, CI_{20} et TP_{50} ne peuvent alors pas être déterminées. Dans ce cas, seules les valeurs TP_{20} et TC_{min} peuvent être déterminées.

58. Il convient de baser les résultats sur la réalisation de deux (ou trois) épreuves indépendantes. Si deux épreuves donnent des résultats comparables et donc reproductibles, il n'est pas nécessaire de réaliser une troisième épreuve. Pour être acceptables, les résultats doivent:

— remplir les critères d'acceptabilité (voir Critères d'acceptabilité paragraphes 14-22;

— être reproductibles.

Critères d'interprétation des données

59. Pour interpréter les données et décider si un produit chimique d'essai est considéré comme positif ou négatif, les critères ci-après sont utilisés:

Activité agoniste

Pour chaque épreuve complète, un produit chimique d'essai est considéré comme **positif** si::

1 la TC_{max} est supérieure ou égale à 10 % de la réponse maximale de l'étalon de référence (REF_{10});

2 au moins deux concentrations consécutives du produit chimique d'essai sont supérieures ou égales à la REF_{10}.

Pour chaque épreuve complète, un produit chimique d'essai est considéré comme **négatif** si::

1 la TC_{max} ne dépasse pas 10 % de la réponse maximale de l'étalon de référence (REF_{10});

2 moins de deux concentrations du produit chimique d'essai sont supérieures ou égales à la REF_{10}.

Activité antagoniste

Pour chaque épreuve complète, un produit chimique d'essai est considéré comme **positif** si:

1 la TC_{min} est inférieure ou égale à 80 % de la réponse maximale de l'étalon de référence (REF_{80} = 20 % d'inhibition);;

2 au moins deux concentrations consécutives du produit chimique d'essai sont inférieures ou égales à la REF_{80}.

▼**M8**

Pour chaque épreuve complète, un produit chimique d'essai est considéré comme **négatif** si:

1 la TC_{min} est supérieure à 80 % de la réponse maximale de l'étalon de référence (REF_{80} = 20 % d'inhibition);;

2 moins de deux concentrations du produit chimique d'essai sont inférieures ou égales à la REF_{80}.

60. Aux fins de caractérisation de la réponse positive d'un produit chimique d'essai, l'amplitude de l'effet (activité agoniste: $TC_{max;;}$ activité antagoniste: TC_{min}) et la concentration à laquelle l'effet se produit (activité agoniste: CE_{10}, CE_{50}, TP_{10}, $TP_{50;;}$ activité antagoniste: CI_{20}, CI_{50}, TP_{80}, TP_{50}) sont consignées.

RAPPORT D'ESSAI

61. Voir le paragraphe 20 de la section «ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE TA ER»

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (2016). Draft Validation report of the (anti-) ERα CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organisation de coopération et de développement économiques, Paris

(2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.

(3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER)α and not through ERβ. *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.

(4) Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology17(6):646-57.

(5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V and Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.

(6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

(7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a Post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.,* 122, 204–211.

(8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.,* 89(1), 173–187.

▼**M8**

(9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.,* 57(4), 769-771.

(10) Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays. J. Biomol. Scr., 4, 67-73

(11) Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, the Netherlands.

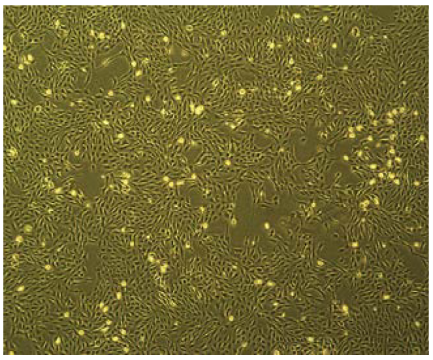
▼**M8**

Appendice 4.1

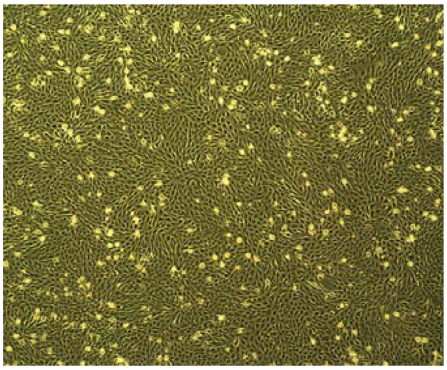
INSPECTION VISUELLE DE LA VIABILITÉ DES CELLULES



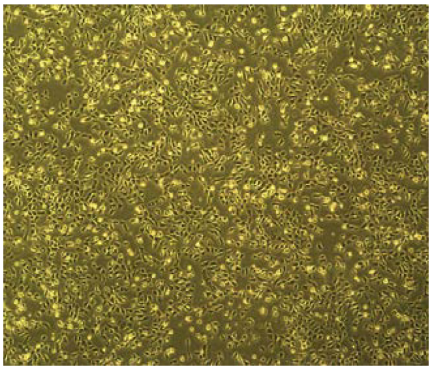
Confluence <5 %. Les cellules viennent d'être ensemencées. Viabilité cellulaire de 100 %.
Classification: «absence de cytotoxicité»



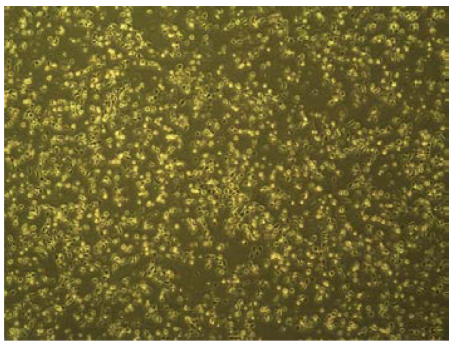
Confluence > 85 %. À ce stade, les cellules sont exposées aux produits chimiques. Viabilité cellulaire > 95 %.
Classification: «absence de cytotoxicité»



Confluence > 95 %. Les cellules sont densément organisées et commencent à proliférer. Viabilité cellulaire > 95 %.
Classification: «absence de cytotoxicité»



Viabilité cellulaire < 25 %. Les cellules commencent à se détacher, le contact entre les cellules diminue. Les cellules sont arrondies.
Classification: «cytotoxicité»



Viabilité cellulaire <5 %. Les cellules sont complètement détachées, le contact entre les cellules est rompu. Les cellules sont arrondies.
Classification: «cytotoxicité»

▼M8

B.67. ESSAIS *IN VITRO* DE MUTATION GÉNIQUE SUR CELLULES DE MAMMIFÈRES UTILISANT LE GÈNE DE LA THYMIDINE KINASE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 490 (2016) de l'OCDE. pour les essais de produits chimiques. Les méthodes d'essai sont régulièrement révisées à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences règlementaires et des considérations relatives au bien-être des animaux. Initialement, l'essai sur cellules de lymphome de souris (ou essai MLA, pour *Mouse Lymphoma Assay*) et l'essai sur TK6 utilisant des loci de la thymidine kinase (TK) figuraient dans la méthode d'essai B.17. Par la suite, le groupe d'experts sur les cellules de lymphome de souris de l'atelier international sur les essais de génotoxicité (IWGT) a élaboré des recommandations internationales harmonisées pour les critères d'acceptation des essais et l'interprétation des données de l'essai MLA (1) (2) (3) (4) (5), et ces recommandations sont incorporées dans la présente nouvelle méthode d'essai B.67. Cette méthode d'essai est rédigée pour l'essai MLA ainsi que pour l'essai sur TK6, car ce dernier utilise également le locus TK. Cependant, alors que l'essai MLA est largement utilisé à des fins réglementaires, l'essai sur TK6 est utilisé bien moins fréquemment. Il est à noter que malgré la similitude de leurs critères d'évaluation, les deux lignées cellulaires ne sont pas interchangeables et des programmes réglementaires peuvent valider une préférence pour l'un par rapport à l'autre dans le cadre d'un usage réglementaire particulier. Par exemple, la validation du MLA a démontré sa pertinence pour la détection des dommages sur la structure des chromosomes causés par le produit chimique d'essai, en plus de la capacité de l'essai pour identifier les mutations géniques. Elle s'inscrit dans une série de méthodes d'essai sur la toxicologie génétique. L'OCDE a élaboré un document contenant des éléments d'information concis sur les essais de toxicologie génétique ainsi qu'un aperçu des récents changements qui ont été apportés aux lignes directrices de l'OCDE concernant la toxicité génétique (6).

2. Les essais *in vitro* de mutation génique sur cellules de mammifères ont pour objectif de détecter des mutations induites par des produits chimiques. Les lignées cellulaires utilisées dans ces essais mesurent les mutations directes dans les gènes rapporteurs, en particulier le gène endogène de la thymidine kinase (*TK* pour les cellules humaines et *Tk* pour les cellules de rongeurs, collectivement dénommés *TK* dans la présente méthode d'essai). Deux lignées cellulaires sont concernées par la présente méthode d'essai: la lignée de cellules de lymphome de souris L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C (généralement dénommée L5178Y) et la lignée de cellules humaines lymphoblastoïdes TK6 (généralement dénommée TK6). Bien que ces deux lignées cellulaires varient en raison de leur origine, croissance cellulaire, statut p53, etc., les essais de mutation génique de la *TK* peuvent être menés de manière similaire dans les deux types de cellules décrits dans la présente méthode d'essai.

3. La nature autosomique et hétérozygote du gène de la thymidine kinase permet de détecter les colonies viables dont les cellules sont déficientes en enzyme thymidine kinase suite à la mutation de $TK^{+/-}$ en $TK^{-/-}$. Ce déficit peut résulter d'événements génétiques affectant le gène de la *TK*, notamment des mutations du gène (mutations ponctuelles, mutations décalant le cadre de lecture, petites délétions, etc.) et des événements chromosomiques (délétions importantes, réarrangements chromosomiques et recombinaison mitotique). Ces derniers événements sont exprimés par la perte d'hétérozygotie, qui est une modification génique courante des gènes suppresseurs lors de la tumorigenèse chez l'homme. En théorie, la perte de la totalité du chromosome portant le gène de la *TK* résultant de l'altération du fuseau et/ou de la non-disjonction mitotique peut être détectée dans l'essai MLA. En effet, l'analyse cytogénétique et moléculaire combinée montre clairement que certains mutants de la TK dans l'essai MLA sont le résultat d'une non-disjonction. Cependant, les données scientifiques démontrent que les tests de mutation génique de la *TK* ne peuvent pas détecter de manière fiable les substances aneugènes lors de l'application des critères de cytotoxicité standard (tels que décrits dans la présente méthode d'essai) et que par conséquent, il ne convient pas d'utiliser ces tests pour détecter ces dernières (7) (8) (9).

▼**M8**

4. Deux classes phénotypiques distinctes de mutants de la *TK* sont générées lors des essais de mutation génique de la *TK*; les mutants dont la croissance est normale qui grandissent à la même vitesse que les cellules TK hétérozygotes, et les mutants à la croissance faible qui grandissent avec des temps de doublement plus longs. Les mutants à la croissance normale et à la croissance faible sont reconnus sous forme de grande colonie ou de petite colonie de mutants dans l'essai MLA, et en tant que colonie de mutants apparaissant précocement ou tardivement dans l'essai sur TK6. La nature moléculaire et cytogénétique des deux sortes de colonies de mutants dans l'essai MLA (petites et grandes) a été étudiée en détail (8) (10) (11) (12) (13). La nature moléculaire et cytogénétique des mutants TK6 apparaissant précocement et tardivement a aussi été largement étudiée (14) (15) (16) (18). Les mutants à la croissance lente pour les deux types de cellules ont subi des lésions génétiques impliquant le ou les gènes régulateurs présumés de la croissance situés près du locus *TK*, ce qui entraîne des temps de doublement plus longs et la formation de petites colonies ou de colonies apparaissant tardivement (18). L'induction de mutants à croissance lente a été associée à des produits chimiques qui induisent des changements structurels bruts au niveau chromosomique. Les cellules dont les lésions n'impliquent pas de gènes régulateurs présumés de la croissance près du locus TK grandissent à des vitesses similaires à celles des cellules parentales et deviennent des mutants à la croissance normale. L'induction de mutants à la croissance essentiellement normale est associée à des produits chimiques agissant principalement comme mutagènes ponctuels. En conséquence, il est essentiel de comptabiliser à la fois les mutants à croissance lente et les mutants à croissance normale afin de détecter tous les mutants et de fournir des informations sur le ou les types de lésions (mutagènes par rapport à clastogènes) induits par le produit chimique d'essai (10) (12) (18) (19).

5. La méthode d'essai est organisée de manière à fournir des informations générales qui s'appliquent aux essais sur cellules de lymphome de souris (MLA) et sur TK6, ainsi que des indications particulières pour les essais individuels.

6. Les définitions des termes employés sont présentées à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

7. Les essais conduits *in vitro* requièrent généralement une source exogène d'activation métabolique, mais celle-ci est incapable de reproduire parfaitement les conditions *in vivo*.

8. On prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de conduire à de faux résultats positifs (à savoir une possible interaction avec le système d'essai) non causés par une interaction entre le produit chimique d'essai et le matériel génétique de la cellule; ces conditions peuvent être une modification du pH ou de l'osmolalité, une interaction avec les composants du milieu (20) (21), ou une cytotoxicité excessive (22) (23) (24). Une cytotoxicité supérieure aux plafonds recommandés tels que définis au paragraphe 28 est considérée comme excessive pour les essais MLA et sur TK6. En outre, il convient de noter que les produits chimiques d'essai qui sont des analogues de la thymidine, ou qui se comportent comme des analogues de la thymidine, peuvent augmenter la fréquence des mutants par croissance sélective des mutants spontanés de fond lors du traitement cellulaire, et que leur évaluation nécessite le recours à des méthodes d'essai additionnelles (25).

9. Pour les nanomatériaux manufacturés, il peut s'avérer nécessaire d'apporter certaines adaptations spécifiques à cette méthode d'essai, mais ces adaptations ne sont pas décrites ici.

10. Avant d'appliquer la présente méthode d'essai à un mélange pour obtenir des données à des fins réglementaires, il convient de vérifier si, et dans l'affirmative pourquoi, elle peut fournir des résultats acceptables dans ce cadre réglementaire. Cette vérification n'est pas nécessaire si l'essai du mélange répond à des exigences réglementaires.

▼**M8**

11. Des cellules déficientes en thymidine kinase (TK), en raison de la mutation directe TK+/- en TK-/-, sont résistantes aux effets cytostatiques de la trifluorothymidine (TFT), un analogue de la pyrimidine. Les cellules riches en TK sont sensibles à la TFT, qui entraîne une inhibition du métabolisme et l'arrêt de la division cellulaire. Ainsi, des cellules mutantes peuvent proliférer en présence de TFT et former des colonies visibles, tandis que les cellules normales qui contiennent l'enzyme TK ne le peuvent pas.

PRINCIPE DE L'ESSAI

12. Des cellules en suspension sont exposées au produit chimique d'essai, en présence et en l'absence d'une source exogène d'activation métabolique (voir paragraphe 19), pendant une période de temps appropriée (voir paragraphe 32), puis sont repiquées afin de déterminer la cytotoxicité et de laisser le phénotype s'exprimer avant la sélection des mutants. On détermine la cytotoxicité en mesurant la croissance relative totale des cultures (CRT, voir paragraphe 25) pour l'essai MLA et la survie relative (SR, voir paragraphe 26) pour l'essai sur TK6. Les cultures traitées sont maintenues dans un milieu de croissance pendant une période de temps suffisante, caractéristique de chaque type de cellule (voir paragraphe 37), afin de permettre une expression phénotypique quasi-optimale des mutations induites. Une fois l'expression phénotypique obtenue, on détermine la fréquence des mutants en ensemençant avec un nombre connu de colonies un milieu contenant l'agent sélectif permettant de détecter les colonies mutantes. Dans un milieu exempt d'agent sélectif, on détermine l'efficacité de clonage (viabilité). Après un temps d'incubation approprié, les colonies sont comptées. La fréquence des mutants est calculée en fonction du nombre de colonies mutantes corrigé par l'efficacité de clonage au moment de la sélection des mutants.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Préparations

Cellules

13. Pour l'essai sur cellules de lymphome de souris (MLA): L'essai MLA ayant été développé et caractérisé en utilisant la sous-lignée $TK^{+/-}$ -3.7.2C de cellules L5178Y, c'est cette sous-lignée spécifique qui doit être utilisée pour cet essai. La lignée cellulaire L5178Y est dérivée d'un lymphome thymique induit par méthylcholanthrène provenant d'une souris DBA-2 (26). Clive et ses collègues ont traité des cellules L5178Y (désignées par Clive sous le nom de $TK^{+/+}$ -3) avec du méthanesulfonate d'éthyle et isolé un clone de $TK^{-/-}$ (désigné sous le nom de $TK^{-/-}$ -3.7) en utilisant de la bromodéoxyuridine comme agent sélectif. Un clone spontané $TK^{+/-}$ (désigné sous le nom de $TK^{+/-}$ -3.7.2.) etun sous-clone (désigné sous le nom de$^{TK+/-}$-3.7.2C) ont été isolés à partir du clone TK-/- et caractérisés pour être utilisés dans l'essai MLA (27). Le caryotype de la lignée cellulaire a fait l'objet d'une publication (28) (29) (30) (31). Le nombre modal de chromosomes est 40. Un chromosome métacentrique (t12; 13) doit être compté comme un chromosome. Le locus *TK* de la souris est situé sur l'extrémité distale du chromosome 11. La lignée de cellules L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C comporte des mutations sur les deux allèles du gène p53 et produit une protéine p53 mutée (32) (33). C'est probablement grâce au statut du gène p53 de la lignée cellulaire $TK^{+/-}$-3.7.2C que l'essai est capable de détecter des lésions à grande échelle (17).

14. Pour l'essai sur TK6: La lignée TK6 est une lignée de cellules humaines lymphoblastoïdes. La lignée cellulaire parentale est une lignée cellulaire transformée par le virus d'Epstein-Barr, WI-L2, initialement dérivée d'un sujet de sexe masculin âgé de 5 ans atteint de sphérocytose héréditaire. Le premier clone isolé, HH4, a été mutagénisé avec de l'ICR191 et une lignée de cellules *TK* hétérozygotes, baptisées K6, a été ainsi générée (34). Les cellules TK6 sont presque toutes diploïdes et le caryotype représentatif est 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Le locus *TK* chez l'homme est situé sur le bras long du chromosome 17. La lignée TK6 est une lignée de cellules compétentes en p53, car elle comporte une séquence p53 de type sauvage dans les deux allèles et exprime seulement la protéine p53 de type sauvage (36).

▼M8

15. Lors de l'établissement initial de la culture mère ou de sa reconstitution pour les essais MLA et sur TK6, il recommandé que le laboratoire d'essai veille à l'absence de contamination par *mycoplasmes*, procède au caryotypage des cellules ou peigne les chromosomes hébergeant le locus *TK*, et vérifie les temps de doublement de la population. La durée normale du cycle cellulaire des cellules utilisées dans le laboratoire d'essai doit être établie et doit correspondre aux caractéristiques cellulaires publiées (16) (19) (37). Cette culture mère doit être conservée à -150 °C ou à une température inférieure et utilisée pour préparer les cultures cellulaires de travail.

16. Avant de produire un grand nombre de cultures de travail cryoconservées ou juste avant d'être utilisée pour une expérience, il pourra s'avérer nécessaire de débarrasser la culture des cellules mutantes qu'elles contiennent [sauf si la fréquence des mutants (FM) dans le témoin avec solvant figure déjà dans la plage de valeurs acceptables — voir le tableau 2 pour l'essai MLA]. On utilise pour cela le méthotrexate (aminoptérine) afin d'écarter les cellules déficientes en TK et on ajoute de la thymidine, de l'hypoxanthine et de la glycine (L5178Y) ou de la 2'-déoxycytidine (TK6) à la culture afin de garantir une croissance optimale des cellules compétentes en TK (19) (38) (39) (40) Des conseils d'ordre général sur les bonnes pratiques concernant l'entretien des cultures cellulaires ainsi que des conseils spécifiques pour les cellules L5178Y et TK6 sont disponibles dans la littérature (19) (31) (37) (39) (41). Pour les laboratoires ayant besoin de cultures cellulaires mères pour lancer un essai sur cellules de lymphome de souris ou TK6 ou pour obtenir de nouvelles cultures cellulaires mères, une banque de cellules bien caractérisées est disponible (37).

Milieu et conditions de culture

17. Pour les deux essais, il convient d'utiliser un milieu de croissance et des conditions d'incubation (par exemple, récipients de culture, atmosphère humidifiée à 5 % de CO_2, température d'incubation de 37 °C) appropriés pour la conservation des cultures. Les cultures cellulaires doivent toujours être maintenues dans des conditions qui garantissent leur croissance en phase exponentielle. Il est particulièrement important de choisir des milieux et des conditions de culture qui stimulent la croissance optimale des cellules pendant la période d'expression et le clonage de cellules, tant mutantes que non mutantes. Pour les essais MLA et sur TK6, il importe également que les conditions de culture garantissent une croissance optimale tant pour les mutants *TK* en grandes colonies/apparaissant précocement que ceux en petites colonies/apparaissant tardivement. De plus amples détails sur les cultures, notamment le besoin de chauffer de manière adéquate le sérum de cheval pour l'inactiver si un milieu RPMI est utilisé lors de la sélection des mutants, sont disponibles dans la littérature (19) (31) (38) (39) (40) (42).

Préparation des cultures

18. Les cellules sont multipliées à partir de cultures mères, placées dans un milieu de culture à une densité telle que les cultures en suspension poursuivront leur croissance de manière exponentielle tout au long du traitement et des périodes d'expression.

Activation métabolique

19. Le recours à un système d'activation métabolique exogène est nécessaire en cas d'utilisation de cellules L5178Y et TK6 dotées d'une capacité métabolique endogène inadéquate. Le système le plus couramment utilisé, recommandé par défaut, sauf justification contraire, est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteur (S9), préparéeà partir de foies de rongeurs (généralement des rats) traités avec des inducteurs enzymatiques comme l'Aroclor 1254 (43) (44) (45) ou une association de phénobarbital et de β-naphthoflavone (46) (47) (48) (49) (50) (51). L'utilisation de ce mélange n'est pas contraire à la Convention de Stockholm sur les polluants

▼M8

organiques persistants (52) et s'est révélée aussi efficace que celle de l'Arcolor 1254 pour l'induction d'oxydases à fonction mixte (45) (46) (47) (48) (49). La fraction S9 est généralement utilisée à une concentration comprise entre 1 et 2 % mais qui peut être portée à 10 % (v/v) dans le milieu d'essai final. Le choix du type et de la concentration du système d'activation métabolique exogène ou de l'inducteur métabolique utilisé pourra dépendre de la classe des produits chimiques à tester.

Préparation du produit chimique d'essai

20. Les produits chimiques solides à tester sont dissous dans un solvant approprié puis, le cas échéant, dilués avant application (voir paragraphe 21). Avant le traitement, les produits chimiques liquides peuvent être ajoutés directement et/ou après dilution au système d'essai. Les produits gazeux ou volatils nécessitent une modification appropriée des protocoles standards, par exemple l'utilisation de récipients de culture hermétiquement clos (53) (54) (55). Il convient de préparer les produits chimiques d'essai juste avant le traitement, à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'ils peuvent être stockés.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Solvants

21. Le solvant doit être choisi de manière à optimiser la solubilité des produits chimiques d'essai, sans engendrer d'effets néfastes sur la conduite de l'essai, c'est-à-dire sans modifier la croissance cellulaire, nuire à l'intégrité du produit chimique d'essai, réagir avec les récipients de culture ou détériorer le système d'activation métabolique. On recommande d'envisager d'abord l'utilisation d'un solvant (ou milieu de culture) aqueux chaque fois que cela est possible. L'eau et le diméthylsulfoxyde sont des exemples de solvants couramment utilisés. En règle générale, les solvants organiques ne doivent pas dépasser 1 % (v/v) et les solvants aqueux (salin ou eau) 10 % (v/v) dans le milieu de traitement final. L'emploi d'un solvant inhabituel (éthanol ou acétone, par exemple) doit être justifié par des données faisant état de sa compatibilité avec le produit chimique d'essai et le système d'essai, ainsi que de son absence de génotoxicité aux concentrations utilisées. En l'absence de telles données, il est important d'inclure dans l'essai des témoins non traités (voir les définitions à l'appendice 1) afin de démontrer que le solvant choisi n'entraîne aucun effet délétère ou mutagène.

MESURE DE LA CYTOTOXICITÉ CELLULAIRE ET CHOIX DES CONCENTRATIONS DU TRAITEMENT

22. Lors de la détermination de la plus forte concentration du produit chimique d'essai à tester, on évitera les concentrations susceptibles de produire de fausses réponses positives, notamment celles qui engendrent une cytotoxicité excessive (voir paragraphe 28), une précipitation (voir paragraphe 29) dans le milieu de culture, ou une modification marquée du pH ou de l'osmolalité (voir paragraphe 8). Si le produit chimique d'essai provoque une modification marquée du pH du milieu au moment de son ajout, il est possible d'ajuster le pH par tamponnage du milieu de traitement final de manière à éviter les faux résultats positifs et à maintenir des conditions de culture appropriées.

23. La concentration est sélectionnée en fonction de la cytotoxicité et d'autres considérations (voir paragraphes 27 à 30). Un essai préliminaire visant à évaluer la cytotoxicité peut s'avérer utile pour mieux cerner les concentrations à utiliser dans l'essai principal, mais il n'est pas obligatoire. Même si une évaluation initiale de la cytotoxicité a été effectuée, il reste indispensable de mesurer la cytotoxicité pour chaque culture dans le cadre de l'expérience principale. Si une expérience est menée pour déterminer les concentrations à utiliser, elle doit couvrir une large gamme de concentrations et doit soit être achevée au Jour 1 après le traitement, soit être menée jusqu'à l'expression du Jour 2 et la sélection des mutants (s'il apparaît que les concentrations utilisées sont appropriées).

▼**M8**

24. La cytotoxicité doit être déterminée pour chaque culture d'essai individuelle et chaque culture témoin: les méthodes à employer pour l'essai MLA (2) et l'essai sur TK6 (15) sont définies par la pratique internationalement reconnue.

25. Pour les deux versions de l'essai MLA, avec gélose et avec micropuits, la cytotoxicité est évaluée en utilisant la croissance relative totale (CRT), initialement définie par Clive et Spector en 1975 (2). Cette mesure comprend la croissance relative en suspension (CRS: culture d'essai par rapport au témoin avec solvant) durant le traitement cellulaire, le délai d'expression et l'efficacité de clonage relative (ECR: culture d'essai par rapport au témoin avec solvant) lorsque les mutants sont sélectionnés (2) Il convient de noter que la CRS inclut toute perte cellulaire se produisant dans la culture d'essai durant le traitement (voir les formules à l'appendice 2).

26. Pour l'essai sur TK6, la cytotoxicité est évaluée au regard de la survie relative (SR), à savoir l'efficacité de clonage des cellules étalées sur plaque immédiatement après le traitement, ajustée en fonction d'éventuelles pertes cellulaires en cours de traitement, en fonction du nombre de cellules comparativement au témoin négatif (à qui l'on a attribué une survie de 100 %) (voir les formules à l'appendice 2).

27. Il convient d'évaluer au moins quatre concentrations d'essai (sans compter les témoins avec solvant et les témoins positifs) remplissant les critères d'acceptabilité (cytotoxicité appropriée, nombre de cellules, etc.). Alors que l'utilisation de cultures en double exemplaire est recommandée, chacune des cultures réalisées en un seul ou plusieurs exemplaires peut être utilisée à chaque concentration d'essai. Les résultats obtenus pour chacune des répliques à une concentration donnée doivent faire l'objet de rapports distincts mais peuvent être regroupés pour l'analyse des données (55). Pour les produits chimiques dont la cytotoxicité est faible ou nulle, des niveaux de concentrations espacés d'un facteur de 2 à 3 environ conviendront généralement. En cas de cytotoxicité, les concentrations d'essai retenues doivent couvrir une plage englobant la concentration produisant une cytotoxicité telle que décrite au paragraphe 28 et les concentrations pour lesquelles une cytotoxicité modérée, faible ou nulle est observée. De nombreux produits chimiques d'essai présentent des courbes concentration-réponse à forte pente et, afin de couvrir toute la plage de valeurs de la cytotoxicité ou pour étudier en détail la réponse à la concentration, il pourra s'avérer nécessaire d'utiliser des concentrations plus rapprochées et plus de quatre concentrations, notamment dans les cas où il est nécessaire de répéter l'expérience (voir paragraphe 70). Si l'on réalise des cultures en un seul exemplaire, il peut être particulièrement important d'utiliser plus de 4 concentrations.

28. Si la concentration maximale est basée sur la cytotoxicité, la concentration la plus forte doit viser une CRT comprise entre 20 et 10 % pour l'essai MLA, et une SR comprise entre 20 et 10 % pour l'essai sur TK6 (paragraphe 67).

29. Pour les produits chimiques d'essai peu solubles qui ne sont pas cytotoxiques à des concentrations inférieures à la concentration insoluble la plus faible, la plus forte concentration analysée doit produire une turbidité ou un précipité visible à l'œil nu ou à l'aide d'un microscope inversé à la fin du traitement avec le produit chimique d'essai. Même si une cytotoxicité intervient au-delà de la concentration insoluble la plus faible, il est recommandé de tester une seule concentration produisant une turbidité ou un précipité visible, car de fausses réponses pourraient découler de ce précipité. Les essais MLA et sur TK6 utilisant des cultures en suspension, il convient de s'assurer particulièrement que ce dernier n'interfère pas avec la conduite de l'essai. Il peut être utile de déterminer la solubilité dans le milieu de culture préalablement à l'essai.

▼M8

30. Si aucun précipité ou aucune cytotoxicité limitante ne sont observés, la concentration d'essai maximale doit correspondre à la plus basse parmi 10 mM, 2 mg/ml ou 2 µl/ml (57) (58). Lorsque la composition du produit chimique d'essai n'est pas définie, par exemple dans le cas de substances de composition inconnue ou variable, de produits de réaction complexes ou de matériels biologiques [c'est-à-dire, subsatnces chimiques de composition inconnue ou variable (UVCB)], de produits extraits de l'environnement etc., il peut être nécessaire d'augmenter la concentration maximale (5 mg/ml par exemple), en l'absence de cytotoxicité suffisante, afin d'accroître la concentration de chacun des composants. Il convient toutefois de noter que ces exigences peuvent être différentes pour les produits pharmaceutiques à usage humain (59).

Témoins

31. Des témoins négatifs concomitants (voir paragraphe 21), constitués uniquement du solvant dans le milieu de traitement et testés de la même façon que les cultures traitées, doivent être inclus pour chaque condition expérimentale.

32. Des témoins positifs concomitants sont nécessaires pour démontrer la capacité du laboratoire d'identifier les mutagènes dans les conditions du protocole d'essai utilisé, ainsi que l'efficacité du système d'activation métabolique exogène (le cas échéant), et pour démontrer la détection adéquate de mutants *TK* en petites colonies/apparaissant tardivement et en grandes colonies/apparaissant précocement. Le tableau 1 ci-dessous présente des exemples de témoins positifs. D'autres substances chimiques peuvent être utilisées comme témoins positifs, si cela est justifié. Étant donné que les essais *in vitro* de génotoxicité sur cellules de mammifères sont suffisamment normalisés en ce qui concerne les traitements parallèles de courte durée (de 3 à 4 heures) effectués avec et sans activation métabolique pendant la même durée de traitement, l'utilisation de témoins positifs peut être limitée à un mutagène nécessitant une activation métabolique. Dans ce cas, cette seule réponse dans un témoin positif démontrera à la fois l'activité du système d'activation métabolique et la réactivité du système d'essai. En cas de traitement de longue durée (c'est-à-dire, 24 heures sans S9), celui-ci doit toutefois disposer de son propre témoin positif, étant donné que la durée du traitement sera différente de celle de l'essai ayant recours à une activation métabolique. Chaque témoin positif doit être utilisé à une ou plusieurs concentrations devant normalement donner lieu à une augmentation reproductible et détectable par rapport à la valeur de fond afin de démontrer la sensibilité du système d'essai, et la réponse ne doit pas être compromise par une cytotoxicité supérieure aux limites fixées dans la présente méthode d'essai (voir paragraphe 28).

Tableau 1

Substances de référence recommandées pour la vérification des compétences du laboratoire et pour la sélection des témoins positifs

Catégorie	Substance	N° CAS
1. Mutagènes actifs sans activation métabolique		
	Méthanesulfonate de méthyle	66-27-3
	Mitomycine C	50-07-7
	N-oxyde de nitro-4 quinoline	56-57-5
2. Mutagènes nécessitant une activation métabolique		
	Benzo(a)pyrène	50-32-8
	Cyclophosphamide (monohydraté)	50-18-0 (6055-19-2)
	Diméthyl-7,12 benzanthracène	57-97-6
	3-Méthylcholanthrène	56-49-5

▼M8

MODE OPÉRATOIRE

Traitement avec le produit chimique d'essai

33. Les cellules en prolifération sont traitées avec le produit chimique d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique. La durée d'exposition doit être suffisante (de 3 à 4 heures sont généralement efficaces). Il convient toutefois de noter que ces exigences peuvent être différentes pour les produits pharmaceutiques à usage humain (59). Pour l'essai MLA, dans les cas où le traitement à court terme donne des résultats négatifs, et si les informations présentes suggèrent la nécessité d'un traitement plus long [par ex., analogues nucléosidiques, produits chimiques faiblement solubles, (5) (59)], il convient d'envisager un traitement plus long, c'est-à-dire, de 24 heures sans S9.

34. Le nombre minimal de cellules utilisées pour chaque culture (témoin et traitée) d'essai à chaque étape de l'essai doit être basé sur la fréquence de mutants spontanés. Il est conseillé en général de traiter et repiquer suffisamment de cellules dans chaque culture expérimentale pour préserver au moins 10, mais dans l'idéal 100, mutants spontanés à toutes les phases de l'essai (traitement, expression phénotypique et sélection des mutants) (56).

35. Pour l'essai MLA, la fréquence de mutants spontanés acceptable recommandée se situe entre 35 et 140 × 10^{-6} (version avec diffusion en gélose) et entre 50 et 170 × 10^{-6} (version avec micropuits) (voir le tableau 2). Pour avoir au moins 10, et dans l'idéal 100, mutants spontanés survivant au traitement pour chaque culture d'essai, il est nécessaire de traiter au moins 6×10^6 cellules. Le traitement de ce nombre de cellules, et la préservation de suffisamment de cellules durant l'expression et le clonage pour la sélection des mutants, permet d'obtenir un nombre suffisant de mutants spontanés (10 ou plus) durant toutes les phases de l'expérience, même pour les cultures traitées à des concentrations qui résultent en une cytotoxicité de 90 % (mesurée par une CRT de 10 %) (19) (38) (39).

36. Pour l'essai sur TK6, la fréquence de mutants spontanés se situe généralement entre 2 et 10 × 10^{-6}. Pour qu'au moins 10 mutants spontanés survivent au traitement pour chaque culture d'essai, il est nécessaire de traiter au moins 20×10^6 cellules. Le traitement de ce nombre de cellules permet d'obtenir un nombre suffisant de mutants spontanés (10 ou plus), même pour les cultures traitées à des concentrations causant une cytotoxicité de 90 % pendant le traitement (SR de 10 %). Il faut en outre qu'un nombre suffisant de cellules soient cultivées durant la période d'expression et étalées sur plaque pour la sélection des mutants (60).

Délai d'expression phénotypique et mesure de la cytotoxicité et de la fréquence des mutants

37. À l'issue de la période de traitement, les cellules sont cultivées pendant une période de temps définie de façon à permettre l'expression phénotypique quasi-optimale de mutants nouvellement induits; cette période est spécifique à chaque lignée cellulaire. Pour l'essai MLA, la période d'expression phénotypique est de 2 jours. Pour l'essai sur TK6, la période d'expression phénotypique est de 3 à 4 jours. Dans le cas d'un traitement de 24 heures, la période d'expression commence après la fin du traitement

38. Durant la période d'expression phénotypique, les cellules sont dénombrées quotidiennement. Pour l'essai MLA, on utilise les nombres de cellules quotidiens pour calculer la croissance en suspension (CS) quotidienne. Suite à la période d'expression de 2 jours, les cellules sont suspendues dans le milieu avec ou sans agent sélectif afin de déterminer le nombre de mutants (plaques de sélection) et l'efficacité de clonage (plaques de viabilité), respectivement. Pour cet essai, il existe deux méthodes également acceptables pour le clonage de sélection de mutants: le procédé de diffusion en gélose molle et le procédé en milieu liquide dans des plaques de 96 puits (19) (38) (39). Le clonage dans l'essai sur TK6 s'effectue en utilisant des milieux liquides et des plaques à 96 puits (16).

▼M8

39. La trifluorothymidine (TFT) est le seul agent sélectif recommandé pour les mutants *TK* (61).

40. Pour l'essai MLA, les plaques de gélose et les plaques micropuits sont comptées après 10 à 12 jours d'incubation. Pour l'essai sur TK6, les colonies contenues dans les plaques micropuits sont évaluées après 10 à 14 jours pour l'identification de mutants apparaissant précocement. Afin de récupérer les mutants TK6 à croissance lente (apparaissant tardivement), il est nécessaire de réalimenter les cellules avec du milieu de croissance et de la TFT après avoir compté les mutants apparaissant précocement, puis d'incuber les plaques pendant 7 à 10 jours supplémentaires (62). Voir aux paragraphes 42 et 44 la discussion concernant le dénombrement des mutants *TK* à croissance lente et à croissance normale.

41. On trouvera à l'appendice 2 les calculs à effectuer pour les deux essais et les deux versions (diffusion en gélose et micropuits) de l'essai MLA. Pour la méthode de diffusion en gélose utilisée dans l'essai MLA, les colonies sont comptées et le nombre de colonies mutantes est ajusté en fonction de l'efficacité de clonage afin de calculer une fréquence des mutants. Pour la version utilisant les micropuits dans l'essai MLA et dans l'essai sur TK6, l'efficacité de clonage pour la sélection et les plaques d'efficacité de clonage est déterminée selon la distribution de Poisson (63). La fréquence des mutants est calculée à partir de ces deux efficacités de clonage.

Caractérisation des colonies de mutants

42. Pour l'essai MLA, si le produit chimique d'essai est positif (voir paragraphes 62 et 63), la caractérisation des colonies en fonction de leur taille ou de leur croissance doit être réalisée sur au moins une des cultures de traitement (généralement exposée à la concentration acceptable donnant la réponse la plus fortement positive) et sur les témoins négatifs et positifs. Si le produit chimique d'essai est négatif (voir paragraphe 64), la caractérisation des colonies mutantes doit être réalisée sur les témoins négatifs et positifs. Pour la méthode des micropuits de l'essai MLA, les mutants en petites colonies sont ceux qui couvrent moins de 25 % du diamètre du puits et les mutants en grandes colonies sont ceux qui couvrent plus de 25 % du diamètre du puits. Pour la méthode de la diffusion en gélose, un compteur de colonies automatique est utilisé pour dénombrer les colonies mutantes et déterminer la taille des colonies. Les méthodes à suivre pour déterminer la taille des colonies sont décrites de manière détaillée dans la littérature (19) (38) (40). Il est nécessaire de caractériser les colonies dans les témoins négatifs et positifs afin de démontrer que les études sont menées de manière appropriée.

43. Le produit chimique d'essai ne peut pas être déterminé comme étant négatif si les mutants en petites et en grandes colonies ne sont pas adéquatement détectés dans les témoins positifs. La caractérisation des colonies peut être utilisée pour fournir des informations d'ordre général concernant la capacité du produit chimique d'essai de causer des mutations ponctuelles et/ou des événements chromosomiques (paragraphe 4).

44. TK6: Les mutants à la croissance normale et à la croissance lente sont différenciés en fonction de la différence de temps d'incubation (voir paragraphe 40). Pour l'essai sur TK6, les mutants apparaissant précocement, ainsi que ceux apparaissant tardivement, sont évalués pour l'ensemble des cultures, y compris les témoins négatifs et positifs. Il est nécessaire de caractériser les colonies pour les témoins négatifs et positifs afin de démontrer que les études sont menées de manière appropriée. Le produit chimique d'essai ne peut pas être déterminé comme étant négatif si les mutants apparaissant précocement ainsi que ceux apparaissant tardivement ne sont pas adéquatement détectés dans le témoin positif. La caractérisation des colonies peut être utilisée pour fournir des informations d'ordre général concernant la capacité du produit chimique d'essai de causer des mutations ponctuelles et/ou des événements chromosomiques (paragraphe 4).

▼M8

Compétence du laboratoire

45. Afin d'acquérir une expérience suffisante de l'essai avant de l'utiliser en routine, le laboratoire doit avoir réalisé une série d'expériences avec des substances chimiques positives de référence agissant selon des mécanismes variés (au moins une avec activation métabolique et une sans activation métabolique, sélectionnées parmi les substances chimiques énumérées au tableau 1) et avec plusieurs témoins négatifs (y compris des cultures non traitées et divers solvants/véhicules). Ces réponses de témoins positifs et négatifs doivent être cohérentes par rapport à la littérature. Cette exigence ne s'applique pas aux laboratoires possédant déjà une expérience, c'est-à-dire, qui disposent d'une base de données historiques telle que définie aux paragraphes 47 à 50. Pour l'essai MLA, les valeurs obtenues pour les témoins positifs et négatifs doivent être cohérentes avec les recommandations de l'IWGT (voir tableau 2).

46. Une sélection de substances chimiques utilisées comme témoins positifs (voir tableau 1) doit être testée dans le cadre de traitements de courte et de longue durée (si l'on utilise des traitements de longue durée) en l'absence d'activation métabolique, ainsi que dans le cadre d'un traitement de courte durée en présence d'une activation métabolique, l'objectif étant de démontrer que le laboratoire possède la compétence nécessaire pour détecter des produits chimiques mutagènes, de déterminer l'efficacité du système d'activation métabolique et de prouver l'adéquation des conditions de croissance cellulaire durant le traitement, l'expression phénotypique et la sélection des mutants, ainsi que l'adéquation des procédures d'évaluation. Il conviendra de définir une plage de concentrations des substances chimiques sélectionnées qui permette d'obtenir des augmentations reproductibles et liées à la concentration par rapport aux valeurs de fond, afin de démontrer la sensibilité et la plage dynamique du système d'essai.

Données des témoins historiques

47. Le laboratoire doit établir:

— une plage et une distribution des témoins positifs historiques,

— une plage et une distribution des témoins négatifs (non traités, avec solvant) historiques.

48. Lors de l'acquisition initiale de données en vue d'établir une distribution des témoins négatifs historiques, les données des témoins négatifs concomitants doivent être cohérentes avec les données publiées. Puis, à mesure que de nouvelles données expérimentales viennent étoffer la plage de distribution des témoins, les données des témoins négatifs concomitants doivent idéalement se situer dans les limites de contrôle à 95 % de cette distribution (64) (65)

49. La base des données historiques du laboratoire relatives aux témoins négatifs doit à l'origine être constituée à partir d'au moins 10 expériences, sachant qu'il serait préférable qu'elle en compte au moins 20, réalisées dans des conditions expérimentales similaires. Les laboratoires doivent avoir recours à des méthodes de contrôle de la qualité telles que des graphiques statistiques [cartes C ou cartes X-barre, par exemple (65)] afin de déterminer la variabilité de leurs données de témoins positifs et négatifs et de démontrer leur maîtrise de la méthodologie (66). D'autres détails et recommandations sur la façon de regrouper et d'utiliser des données historiques sont fournis dans la littérature (64).

50. Les données des témoins négatifs désignent la fréquence des mutants issus de cultures réalisées en un seul exemplaire, ou de préférence de cultures répliquées, comme décrit au paragraphe 27. Les témoins négatifs concomitants se situent idéalement dans les limites de contrôle à 95 % de la distribution des données historiques des témoins négatifs contenues dans la base de données du laboratoire. Lorsque les données des témoins négatifs concomitants se situent en dehors des limites de contrôle à 95 %, leur inclusion dans la distribution des témoins historiques peut être acceptable à condition que ces données ne soient pas exagérément extrêmes et qu'il soit prouvé que le système d'essai est «sous contrôle» (voir paragraphe 49) et qu'il n'y a pas eu de défaillance technique ou d'erreur humaine.

▼M8

51. Toute modification du protocole expérimental doit être étudiée en termes de cohérence avec les bases de données des témoins historiques existantes du laboratoire. Toute incohérence majeure doit conduire à l'établissement d'une nouvelle base de données des témoins historiques.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Présentation des résultats

52. La présentation de données pour les essais sur cellules de lymphome de souris (MLA) et sur TK6 comprendra, pour les cultures traitées et témoins, les données requises pour le calcul de la cytotoxicité (CRT ou SR, respectivement) et les fréquences des mutants, comme décrit ci-dessous.

53. Pour l'essai MLA, les données seront présentées séparément pour chaque culture en ce qui concerne la CRS, la CRT, l'efficacité de clonage au moment de la sélection des mutants et le nombre de colonies de mutants (pour la version utilisant la diffusion en gélose) ou le nombre de puits vides (pour la version utilisant les micropuits). La fréquence des mutants sera exprimée par le nombre de cellules mutantes par million de cellules survivantes. Si la réponse est positive, les fréquences des mutants en petites et grandes colonies (et/ou le pourcentage de la fréquence des mutants totale) seront données pour au moins une concentration du produit chimique d'essai (en général la concentration positive la plus élevée) et les témoins positifs et négatifs. En cas de réponse négative, la fréquence des mutants en petite et en grande colonie doit être donnée pour le témoin négatif et pour le témoin positif.

54. Pour l'essai sur TK6, les données seront présentées séparément pour chaque culture en ce qui concerne la SR, l'efficacité de clonage au moment de la sélection de mutants et le nombre de puits vides pour les mutants apparaissant précocement et ceux apparaissant tardivement. La fréquence des mutants sera exprimée comme le nombre de cellules mutantes divisé par le nombre des cellules survivantes, et inclura la fréquence des mutants totale ainsi que la fréquence des mutants (et/ou le pourcentage de la fréquence des mutants totale) correspondant aux mutants apparaissant précocement ou tardivement.

Critères d'acceptabilité

55. Pour les essais MLA et sur TK6, il convient de veiller à ce que les critères suivants soient remplis avant de déterminer les résultats globaux pour un produit chimique d'essai spécifique:

— Deux conditions expérimentales (traitement de courte durée avec et sans activation métabolique — voir paragraphe 33) ont été testées, à moins que l'une d'entre elles ait abouti à des résultats positifs.

— Un nombre adéquat de cellules et de concentrations sont analysables (paragraphes 27 et 34 à 36).

— Les critères de sélection de la concentration maximale sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 28 à 30.

Critères d'acceptabilité pour les témoins négatifs et positifs

56. L'analyse effectuée par le groupe d'experts sur les cellules de lymphome de souris de l'IWGT portant sur une grande quantité de données provenant de l'essai MLA a donné lieu à un consensus international sur des critères d'acceptabilité spécifiques de l'essai MLA (1) (2) (3) (4) (5). C'est pourquoi la présente méthode d'essai fournit des recommandations spécifiques pour la détermination de l'acceptabilité des témoins positifs et négatifs et pour l'évaluation des résultats d'une substance individuelle dans le cadre d'un essai MLA. La base de données relative à l'essai sur TK6 est beaucoup plus restreinte et n'a pas été évaluée par un groupe de travail.

▼M8

57. Pour l'essai MLA**,** chaque expérience doit être évaluée afin de déterminer si le témoin non traité/avec solvant satisfait aux critères d'acceptabilité du groupe de travail MLA de l'IWGT ((4) et le tableau 2 ci-dessous) en ce qui concerne: (1) la fréquence des mutants (FM) (il est à noter que les FM acceptables selon l'IWGT sont différentes pour les versions utilisant la diffusion en gélose et celles utilisant des micropuits), (2) l'efficacité de clonage (EC) au moment de la sélection des mutants et (3) la croissance en suspension (CS) pour le témoin avec solvant (voir les formules à l'appendice 2).

Tableau 2

Critères d'acceptabilité pour l'essai sur cellules de lymphome de souris (MLA)

Paramètre	Méthode gélose molle	Méthode micropuits
Fréquence des mutants	35 à 140 × 10^{-6}	50 à 170 × 10^{-6}
Efficacité de clonage	65 à 120 %	65 à 120 %
Croissance en suspension	8 à 32 fois (3 à 4 heures de traitement) 32 à 180 fois (24 heures de traitement, si effectué)	8 à 32 fois (3 à 4 heures de traitement) 32 à 180 fois (24 heures de traitement, si effectué)

58. Pour l'essai MLA, chaque test doit également être évalué pour déterminer si le ou les témoins positifs satisfont à au moins un des deux critères d'acceptabilité suivants définis par le groupe de travail de l'IWGT:

— Le témoin positif démontre une augmentation absolue de la fréquence des mutants totale, c'est-à-dire, une augmentation supérieure à la fréquence des mutants spontanée de fond [une fréquence des mutants induite (FMI) d'au moins 300 × 10^{-6}]. Au moins 40 % de la FMI doit correspondre à la fréquence des mutants en petite colonie.

— Le témoin positif présente une augmentation de la fréquence des mutants en petite colonie d'au moins 150 × 10^{-6} supérieure à celle observée dans le témoin concomitant non traité/avec solvant (une FMI en petite colonie de 150 × 10^{-6}).

59. Pour l'essai sur TK6, un essai sera acceptable si les données relatives au témoin négatif concomitant sont considérées comme pouvant être ajoutées à la base de données des témoins négatifs historiques du laboratoire (voir paragraphes 48 à 49). En outre, les témoins positifs concomitants (voir paragraphe 32) doivent induire des réponses compatibles avec celles générées dans la base de données des témoins positifs historiques et produire une augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins négatifs concomitants.

60. Pour les deux essais, la limite supérieure de cytotoxicité observée dans la culture du témoin positif doit être la même que celle des cultures expérimentales. En d'autres termes, les CRT/SR ne doivent pas être inférieures à 10 %. Il est suffisant d'utiliser une seule concentration (ou une des concentrations des cultures de témoins positifs si plus d'une concentration est utilisée) pour démontrer que les critères d'acceptabilité pour le témoin positif sont respectés. De plus, la fréquence des mutants du témoin positif doit figurer dans la plage acceptable des valeurs établies pour le laboratoire.

Évaluation et interprétation des résultats

61. Pour l'essai MLA, le groupe d'experts sur les cellules de lymphome de souris de l'IWGT a consacré d'importants travaux à la pertinence biologique et aux critères d'une réponse positive par (4). C'est pourquoi la présente méthode d'esssai fournit des recommandations spécifiques pour l'interprétation des résultats de l'essai MLA concernant le produit chimique d'essai

▼M8

(voir paragraphes 62 à 64). La base de données relative à l'essai sur TK6 est beaucoup plus restreinte et n'a pas été évaluée par un groupe de travail. C'est pourquoi les recommandations concernant l'interprétation des données pour l'essai sur TK6 sont exprimées en termes plus généraux (voir paragraphes 65 et 66). Des recommandations complémentaires s'appliquent aux deux essais (voir paragraphes 67 à 71).

MLA

62. Il est recommandé d'adopter une approche permettant de définir les réponses positives et négatives afin de veiller à ce que l'augmentation de la fréquence des mutants soit biologiquement pertinente. Au lieu d'une analyse statistique généralement utilisée pour d'autres essais, cette approche s'appuie sur l'utilisation d'une fréquence de mutants induite prédéfinie (c'est-à-dire, une augmentation de la fréquence des mutants supérieure à celle du témoin concomitant), désignée sous le nom de Facteur d'évaluation global (FEG), et basée sur l'analyse de la distribution des données de fréquence des mutants du témoin négatif des laboratoires participants (4). Pour la version de l'essai MLA utilisant la méthode de diffusion en gélose, le FEG est de 90×10^{-6} et pour la version de l'essai MLA utilisant la méthode des micropuits, le FEG est de 126×10^{-6}.

63. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si, dans les conditions expérimentales étudiées (voir paragraphe 33), l'augmentation de la fréquence des mutants au-delà de la fréquence de fond concomitante excède le FEG, et si cette augmentation est liée à la concentration (par exemple au moyen d'un test de tendance). Le produit chimique d'essai est alors considéré comme capable d'induire des mutations dans ce système d'essai.

64. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si, dans toutes les conditions expérimentales étudiées (voir paragraphe 33), il n'y a pas de réponse liée à la concentration ou, si l'on observe une augmentation de la fréquence des mutants, celle-ci n'est pas supérieure au FEG. Le produit chimique d'essai est alors considéré comme incapable d'induire des mutations dans ce système d'essai.

TK6

65. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si, dans les conditions expérimentales étudiées (voir paragraphe 33):

— au moins une concentration d'essai présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant;

— un test de tendance approprié montre que l'augmentation est liée à la concentration (voir paragraphe 33);

— les résultats se situent à l'extérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson, par exemple; voir paragraphe 48).

Lorsque tous ces critères sont remplis, le produit chimique d'essai est considéré comme capable d'induire des mutations dans ce système d'essai. Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont disponibles dans la littérature (66) (67).

66. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si, dans toutes les conditions expérimentales étudiées (voir paragraphe 33):

— aucune concentration d'essai ne présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant;

— un test de tendance approprié montre qu'il n'y a pas d'augmentation liée à la concentration;

▼**M8**

— l'intégralité des résultats se situe à l'intérieur de la distribution des données des témoins négatifs historiques (limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson, par exemple; voir paragraphe 48).

Le produit chimique d'essai est alors considéré comme incapable d'induire des mutations dans ce système d'essai.

Pour les deux essais MLA et sur TK6:

67. Si la concentration maximale est basée sur la cytotoxicité, la concentration la plus forte doit viser une CRT/SR comprise entre 20 et 10 %. De l'avis général, il faut faire preuve de prudence lors de l'interprétation de résultats positifs uniquement trouvés à une CRT/SR comprise entre 20 et 10 %, et un résultat ne doit être considéré comme positif que si l'augmentation de la fréquence des mutants se produit à une CRT/SR inférieure ou égale à 10 % (si évaluée) (2) (59).

68. Dans certaines circonstances, des informations supplémentaires peuvent aider à déterminer si un produit chimique d'essai n'est pas mutagène lorsqu'aucune culture ne présente une valeur de la CRT à une CRT/SR comprise entre 10 et 20 %. Ces circonstances sont les suivantes: (1) Il n'y a pas de signe de mutagénicité (par exemple, aucune relation dose-réponse, aucune fréquence des mutants supérieure à celles observées dans le témoin négatif concomitant ou les valeurs de fond historiques, etc.) dans une série de points de données situés entre 100 % et 20 % de CRT/RS, et présence d'au moins un point de données entre 20 % et 25 % de CRT/RS. (2) Il n'y a pas de signe de mutagénicité (par exemple, aucune relation dose-réponse, aucune fréquence des mutants supérieure à celles observées dans le témoin négatif concomitant ou les valeurs de fond historiques, etc.) dans une série de points de données situées entre 100 % et 25 % de CRT/RS, et présence d'un point de données négatif légèrement inférieur à 10 % de CRT/RS. Dans ces deux cas, il peut être conclu que le produit chimique d'essai est négatif.

69. Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse clairement positive ou négative.

70. Lorsque la réponse n'est ni clairement négative ni clairement positive, tel que décrit ci-dessus, ou en vue d'établir la signification biologique d'un résultat, les données doivent être soumises à un jugement d'expert et/ou des investigations plus poussées. Il peut être utile de répéter l'expérience, éventuellement dans des conditions expérimentales modifiées [espacement des concentrations de façon à augmenter la probabilité d'atteindre des points de données dans la plage de valeurs de 10 à 20 % de CRT/SR, autres conditions d'activation métabolique (c'est-à-dire, concentration de S9 ou origine de S9) et durée du traitement, par exemple].

71. Dans de rares cas, même après de nouvelles investigations, l'ensemble de données ne permettra pas de conclure que les résultats sont positifs ou négatifs. La réponse au produit chimique d'essai devra alors être considérée comme équivoque (et donc potentiellement aussi bien positive que négative).

RAPPORT D'ESSAI

72. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Produit chimique d'essai:

— source, numéro de lot, date limite d'utilisation si disponibles;

— stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue;

— solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant, si elles sont connues;

▼**M8**

— mesure du pH, de l'osmolalité et de la précipitation dans le milieu de culture auquel le produit chimique d'essai a été ajouté, le cas échéant.

Substance mono-constituant:

— apparence physique, hydrosolubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude;

— identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés, s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges:

— caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants.

Solvant:

— justification du choix du solvant;

— pourcentage de solvant présent dans le milieu de culture final.

Cellules:

Pour les cultures mères du laboratoire:

— type et source des cellules, et antécédents dans le laboratoire d'essai;

— caractéristiques du caryotype et/ou nombre modal de chromosomes;

— méthodes d'entretien des cultures cellulaires;

— absence de mycoplasmes;

— temps de doublement des cellules.

Conditions de l'essai:

— justification du choix des concentrations et du nombre de cultures, y compris données concernant la cytotoxicité et les limites de solubilité, par exemple;

— composition du milieu, concentration de CO2, degré d'humidité;

— concentration du produit chimique d'essai sous la forme de sa concentration finale dans le milieu de culture (par exemple, en µg ou mg/ml ou mM du milieu de culture);

— concentration (et/ou volume) de solvant et de produit chimique d'essai ajoutée au milieu de culture;

— température d'incubation;

— temps d'incubation;

— durée du traitement;

— densité des cellules pendant le traitement;

▼**M8**

— type et composition du système d'activation métabolique (source du S9, méthode de préparation du mélange S9, concentration ou volume de mélange S9 et de S9 dans le milieu de culture final, contrôles de la qualité du S9);

— substances témoins positives et négatives, concentrations finales pour chacune des conditions de traitement;

— durée de la période d'expression (avec le nombre de cellules déposées et de repiquages et les programmes de nutrition, le cas échéant);

— identité de l'agent sélectif et sa concentration;

— pour l'essai MLA, la version utilisée (méthode de diffusion en gélose ou micropuits) doit être précisée;

— critères d'acceptabilité des essais;

— méthodes utilisées pour dénombrer les cellules viables et les cellules mutantes;

— méthodes utilisées pour mesurer la cytotoxicité;

— toute information supplémentaire concernant la cytotoxicité et la méthode utilisée;

— temps d'incubation après étalement sur une plaque;

— définition des colonies dont le type et la taille sont pris en compte (y compris les critères pour les «petites» et «grandes» colonies, le cas échéant);

— critères pour conclure que l'étude est positive, négative ou équivoque;

— méthodes utilisées pour déterminer le pH et l'osmolalité, si cela a été effectué, et la précipitation, si cela est pertinent.

Résultats:

— nombre de cellules exposées et nombre de cellules repiquées pour chaque culture;

— paramètres de toxicité (CRT pour l'essai MLA et SR pour l'essai sur TK6);

— signes de précipitation et moment de la détermination;

— nombre de cellules étalées sur plaque dans un milieu sélectif et dans un milieu non sélectif;

— nombre de colonies dans un milieu non sélectif et nombre de colonies résistantes dans un milieu sélectif, et fréquences de mutants correspondantes;

— taille des colonies pour les témoins négatifs et positifs et, si le produit chimique est positif, au moins une concentration, et fréquences des mutants correspondantes;

— relation concentration-réponse, si possible;

— données relatives aux témoins négatifs (solvants) et positifs (concentrations et solvants) concomitants;

— données relatives aux témoins négatifs (solvants) et positifs (concentrations et solvants) historiques, y compris ordres de grandeur, moyennes, écarts-types, nombre d'essais sur lesquels les témoins historiques sont basés;

▼M8

— analyses statistiques (pour chaque culture et chaque lot de réplicats, le cas échéant), et valeurs p, le cas échéant; et pour l'essai MLA, évaluation du FEG.

Discussion des résultats.

Conclusion

BIBLIOGRAPHIE

(1) Moore, M.M., Honma, M. Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185-190.

(2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292-299.

(3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127-140.

(4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1-5.

(5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36-40.

(6) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, N° 234, OECD, Paris.

(7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21-28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101-114.

▼**M8**

(9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci.., 109 (1): 96-105.

(10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. USA, 87 (1): 51-55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169-181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237-242.

(13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): 161-174.

(14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143-153.

(15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77-87.

(16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89-98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203-14.

(18) Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): 89-95.

(19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.

(20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634 (1-2): 177-183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439-452.

(22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879-886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297-305.

▼**M8**

(24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257: 147-204.

(25) Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1-2): 185-190.

(26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673-680.

(27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61-108.

(28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243-253.

(29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181-193.

(30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127-131.

(31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35-42.

(32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): 157-165.

(33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): 263-268.

(34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): 411–416.

(35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45 (2-3): 162-176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): 12-15.

▼**M8**

(37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation).

(38) Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.

(39) Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. In: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell(Eds) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467-485.

(41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): 261-287.

(42) Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287-294.

(43) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31 (6): 347-364.

(44) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173-215.

(45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37 (1): 83-90.

(46) Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66 (3): 277-290.

(47) Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. *Pathol*. *Toxicol*., 4 (1): 55-65

(48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen., 7 (3): 175-177.

(49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

▼**M8**

(50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241-261.

(51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28 (1): 51-59.

(52) PNUE. (2001). Convention de Stockholm sur les Polluants Organiques Persistants, Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE).

(53) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L.and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, pp. 91-103.

(54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795-801.

(55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122-130.

(56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32-56.

(58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36-43.

(59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Available at: [https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

(60) Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373-384.

(61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363-378.

(62) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9-17.

(63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1-8.

(64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87-90.

▼**M8**

(65) Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.

(66) OCDE (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 199.), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(67) Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

▼**M8**

Appendice 1

DÉFINITIONS

Aneugène: produit chimique ou processus qui, via des interactions avec les composants de la cellule mitotique ou méiotique lors de la division cellulaire, provoque la formation de cellules ou d'organismes aneuploïdes.

Aneuploïdie: tout écart par rapport au nombre diploïde (ou haploïde) normal de chromosomes, d'un seul ou de plusieurs chromosomes, mais non d'un ou de plusieurs jeux de chromosomes (polyploïdie).

Clastogène: produit chimique ou processus induisant des aberrations chromosomiques structurelles dans des populations cellulaires ou des organismes.

Croissance en suspension (CS): facteur d'augmentation du nombre de cellules au cours du traitement et des phases d'expression de l'essai sur cellules de lymphome de souris (MLA). On calcule la CS en multipliant le facteur d'augmentation le Jour 1 par le facteur d'augmentation le Jour 2 pour le traitement de courte durée (3 ou 4 heures). Dans le cas d'un traitement sur 24 heures, la CS correspond au facteur d'augmentation durant le traitement de 24 heures multiplié par les facteurs d'augmentation des jours d'expression 1 et 2.

Croissance relative en suspension (CRS): pour l'essai sur cellules de lymphome de souris (MLA), augmentation relative sur deux jours du nombre total de cellules en suspension dans une culture d'essai comparée à l'augmentation totale sur deux jours du nombre de cellules en en suspension dans le témoin négatif/avec solvant (Clive et Spector, 1975). La CRS doit comprendre la croissance relative de la culture d'essai comparée à celle du témoin négatif/avec solvant durant la période de traitement.

Croissance relative totale (CRT): la CRT est utilisée pour mesurer la toxicité liée au traitement dans l'essai sur cellules de lymphome de souris (MLA). Elle mesure la croissance relative (par rapport au témoin avec véhicule) des cultures d'essai durant les phases de traitement, d'expression sur deux jours et de clonage de sélection des mutants de l'essai. La CRS de chaque culture d'essai est multipliée par l'efficacité de clonage relative de la culture d'essai au moment de la sélection de mutants et exprimée par rapport à l'efficacité de clonage du témoin négatif/avec solvant (Clive et Spector, 1975).

Cytotoxicité: pour les essais visés par la présente méthode d'essai, la cytotoxicité correspond à une baisse de la croissance relative totale (CRT) ou de la survie relative (SR) pour l'essai sur cellules de lymphome de souris (MLA) et l'essai sur TK6, respectivement.

Délai d'expression phénotypique: délai après traitement au bout duquel l'altération génique est fixée dans le génome et tous les produits géniques préexistants sont épuisés au point que le caractère phénotypique est modifié.

Efficacité de clonage: pourcentage de cellules étalées sur plaque à une faible densité qui sont capables de se développer pour former une colonie dénombrable.

Fraction S9 de foie: surnageant d'homogénat de foie centrifugé à 9 000 g (extrait de foie cru)

Fréquence des mutants (FM): nombre de mutants observés divisé par le nombre de cellules viables.

Génotoxique: terme générique qualifiant tous les types de lésions de l'ADN ou des chromosomes, tels que les cassures, adduits, remaniements, mutations, aberrations chromosomiques et aneuploïdies. Tous les types d'effets génotoxiques n'entraînent pas nécessairement de mutations ou de lésions chromosomiques stables.

Mélange S9: mélange de fraction S9 de foie et de cofacteurs nécessaires à l'activité des enzymes métaboliques.

Mutagène: qui produit une modification héréditaire portant sur une ou plusieurs séquences de paires de bases d'ADN génique, ou sur la structure de chromosomes (aberrations chromosomiques).

Mutagènes décalant le cadre de lecture: produits chimiques entraînant l'addition ou la délétion d'une ou de plusieurs paires de bases dans la molécule d'ADN.

▼**M8**

Mutagènes provoquant la substitution de paires de bases: produits chimiques qui entraînent le remplacement d'une ou de plusieurs paires de bases de l'ADN.

Mutation directe: mutation de gène de la forme parentale en une forme mutante, qui engendre une modification ou une perte de l'activité enzymatique ou de la fonction de la protéine codée.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Recombinaison mitotique: durant la mitose, recombinaison entre chromatides homologues pouvant induire des cassures double brin de l'ADN ou une perte d'hétérozygotie.

Survie relative (SR): la SR sert à mesurer la cytotoxicité liée au traitement dans l'essai sur TK6. Elle correspond à l'efficacité de clonage relative (ECR) des cellules étalées sur plaques immédiatement après le traitement cellulaire, ajustée en fonction d'une éventuelle perte de cellules en cours de traitement, par rapport à l'efficacité de clonage du témoin négatif.

Témoin avec solvant: terme générique désignant les cultures témoins recevant uniquement le solvant utilisé pour dissoudre le produit chimique d'essai.

Témoins non traités: cultures ne recevant aucun traitement (ni produit chimique d'essai ni solvant) mais préparées parallèlement et de la même façon que les cultures exposées au produit chimique d'essai.

▼**M8**

Appendice 2

FORMULES

Cytotoxicité

Pour les deux versions (gélose et micropuits) de l'essai sur cellules de lymphome de souris (MLA)

La cytotoxicité est définie par la croissance relative totale (CRT) qui comprend la croissance relative en suspension (CRS) durant la période d'expression de 2 jours et l'efficacité de clonage relative (ECR) obtenue au moment de la sélection de mutants. La CRT, la CRS et l'ECR sont toutes exprimées en pourcentage.

Calcul de la CRS: La croissance en suspension un (CS_1) correspond au taux de croissance entre le Jour 0 et le Jour 1 (concentration cellulaire au Jour 1 / concentration cellulaire au Jour 0) et la croissance en suspension deux (CS_2) correspond au taux de croissance entre le Jour 1 et le Jour 2 (concentration cellulaire au Jour 2 / concentration cellulaire au Jour 1). La CRS correspond à la CS totale (CS_1 x CS_2) pour la culture traitée comparée au témoin non traité/ avec solvant. C'est-à-dire: CRS = [$CS_{1\ (essai)}$ x $CS_{2\ (essai)}$] / [$CS_{1\ (témoin)}$ x $CS_{2\ (témoin)}$]. La CS_1 doit être calculée à partir de la concentration cellulaire initiale utilisée au début du traitement des cellules. Cela permet de tenir compte d'une éventuelle cytotoxicité différentielle se manifestant dans la ou les cultures d'essai durant le traitement des cellules.

L'ECR est l'efficacité de clonage relative de la culture d'essai comparée à l'efficacité de clonage relative du témoin non traité/avec solvant obtenue au moment de la sélection des mutants.

Croissance relative totale (CRT): CRT = CRS x ECR

TK6

Survie relative (SR):

La cytotoxicité est évaluée par la survie relative, c'est-à-dire l'efficacité de clonage (EC) des cellules étalées sur plaque immédiatement après le traitement cellulaire, ajustée en fonction d'une éventuelle perte de cellules en cours de traitement, par rapport à l'efficacité de clonage sur les témoins négatifs (à qui l'on attribue une survie de 100 %). L'ajustement pour la perte de cellules durant le traitement peut être calculé de la manière suivante:

$$\text{EC ajustée} = \text{EC} \times \frac{\textit{Nombre de cellules à la fin du traitement}}{\textit{Nombre de cellules au début du traitement}}$$

La SR pour une culture traitée par un produit chimique d'essai est calculée comme suit:

$$RS = \frac{\textit{EC ajustée pour la culture traitée}}{(\textit{EC ajustée pour le témoin avec solvant})} \times 100$$

Fréquence des mutants pour les essais MLA et TK6

La fréquence des mutants (FM) correspond à l'efficacité de clonage de colonies de mutants dans un milieu sélectif (EC_M), ajustée en fonction de l'efficacité de clonage dans un milieu non sélectif mesurée au moment de la sélection des mutants (EC_V). C'est-à-dire, FM = EC_M/EC_V. Le calcul de ces deux efficacités de clonage est décrit ci-dessous pour les méthodes avec gélose et avec micropuits.

▼**M8**

Version avec diffusion en gélose de l'essai MLA: Dans la version de l'essai MLA utilisant de la gélose molle, le nombre de colonies sur la plaque de sélection des mutants (C_M) et le nombre de colonies sur la plaque non sélectionnée ou servant à déterminer l'efficacité de clonage (nombre viable) (C_V) sont obtenus par comptage direct des clones. Lorsque 600 cellules sont étalées sur les plaques afin de déterminer l'efficacité de clonage (EC), les plaques destinées à la sélection des mutants (EC_M) et les plaques non sélectionnées ou servant à mesurer l'efficacité de clonage (nombre viable) (EC_V) et que 3×10^6 cellules sont utilisées pour la sélection des mutants,

$EC_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$

$EC_V = C_V / 600$

Version avec micropuits pour les essais MLA et sur TK6: dans la version avec micropuits de l'essai MLA, la C_M et la C_V sont déterminées comme étant le produit du nombre total de micropuits (TM) et du nombre probable de colonies par puits (P) sur les plaques micropuits.

$C_M = P_M \times TM_M$

$C_V = P_V \times TM_V$

À partir du terme zéro de la distribution de Poisson (Furth *et al*., 1981), on obtient P de la façon suivante:

$P = - \ln (PV / TM)$

Où, PV désigne les puits vides et TM le total des puits. Par conséquent,

$EC_M = C_M / T_M = (P_M \times TM_M) / T_M$

$EC_V = C_V / T_V = (P_V \times TM_V) / T_V$

Pour la version de l'essai MLA utilisant les micropuits, la fréquence des mutants dans les petites colonies et les grandes colonies sera calculée de manière identique, en utilisant le nombre pertinent de puits vides pour les petites et les grandes colonies.

Pour l'essai sur TK6, la fréquence des mutants des petites et des grandes colonies est calculée en fonction des mutants apparaissant précocement et des mutants apparaissant tardivement.

▼M8

B.68. **MÉTHODE D'ESSAI D'EXPOSITION DE COURTE DURÉE IN VITRO POUR L'IDENTIFICATION DES PRODUITS CHIMIQUES i) PROVOQUANT DES LÉSIONS OCULAIRES GRAVES OU ii) NE RELEVANT D'AUCUNE CLASSIFICATION POUR IRRITATION OCULAIRE OU LÉSION OCULAIRE GRAVE**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrie 491 (2017) de l'OCDE. La méthode d'exposition de courte durée (*Short Time Exposure,* STE) est une méthode d'essai *in vitro* qui, dans certaines circonstances et assortie de restrictions spécifiques, peut être utilisée pour la classification des dangers et l'étiquetage des produits chimiques (substances et mélanges) provoquant des lésions oculaires graves ou ne relevant d'aucune classification pour lésion oculaire grave ou irritation oculaire, conformément au Système général harmonise de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU) (1) et au règlement (CE) n° 1272/2008 de l'Union européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (ci-après le «règlement CLP») ([1]).

2. Pendant de nombreuses années, les dangers potentiels pour l'œil que présentent les produits chimiques ont été principalement évalués par des tests *in vivo* effectués sur des yeux de lapins (méthode d'essai B.5, équivalente à la ligne directrice 405 de l'OCDE). Il est généralement admis que dans notre horizon de prévision, aucun essai unique d'irritation oculaire *in vitro* ne pourra remplacer le test *in vivo* sur œil de lapin pour établir le degré d'irritation ou de lésion oculaire grave provoque par les différentes classes de produits chimiques. Cependant, la combinaison de plusieurs méthodes de substitution dans le cadre d'une stratégie d'essais (à plusieurs niveaux) pourrait remplacer le test sur les yeux de lapin (2). L'approche «top-down» est indiquée lorsque, d'après les informations existantes, on s'attend à ce qu'un produit chimique soit fortement irritant ou puisse provoquer de graves lésions oculaires, alors que l'approche «bottom-up» est conçue pour être appliquée quand, au vu des informations existantes, un produit chimique devrait a priori ne pas causer une irritation oculaire suffisante pour nécessiter une classification. Alors que la méthode STE n'est pas jugée valable pour remplacer purement et simplement la méthode d'essai *in vivo* sur œil de lapin, son utilisation est acceptable comme élément d'une stratégie d'essai à plusieurs niveaux visant à établir une classification et un étiquetage réglementaires, telle que l'approche «top-down»/«bottom-up», pour identifier sans experimentation supplémentaire les produits chimiques (i) provoquant des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP) et (ii) les produits chimiques (à l'exception des substances hautement volatiles et de tous les produits solides autres que les tensioactifs) qui ne nécessitent aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave («sans catégorie» du SGH de l'ONU/du règlement CLP) (1) (2). Toutefois, un produit chimique qui, avec la méthode STE, n'est pas identifié comme provoquant des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP) ou comme ne relevant d'aucune classification («sans catégorie» du SGH de l'ONU/du règlement CLP) nécessiterait d'être soumis à des essais complémentaires visant à établir une classification définitive. En outre, les autorités réglementaires compétentes devraient être consultées avant de mettre en œuvre la méthode STE dans une approche «bottom-up» dans le cadre d'autres systèmes de classification que le SGH de l'ONU/du règlement CLP. Le choix de la méthode d'essai la plus pertinente et l'utilisation de cette méthode d'essai doivent être envisagés dans le contexte du Document d'orientation de l'OCDE sur les Approches Intégrées sur les Essais et l'Évaluation pour les lésions oculaires sévères et l'irritation de l'œil (14).

3. L'objet de la présente méthode d'essai est de décrire les procédures utilisées pour évaluer le danger potentiel qu'un produit chimique d'essai présente pour l'œil, mesure par le caractère cytotoxique du produit chimique lors d'un test d'exposition de courte durée (STE). L'effet cytotoxique des

([1]) Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006, JO L 353 du 31.12.2008, p. 1

▼M8

produits chimiques sur les cellules épithéliales cornéennes est un mécanisme d'action important qui provoque des lésions de l'épithélium cornéen et une irritation oculaire. Dans la méthode d'essai STE, la viabilité cellulaire est évaluée par un dosage quantitatif des cristaux de formazan bleu extraits des cellules et produits par les cellules vivantes lors de la conversion enzymatique du colorant vital MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium), encore appelé Bleu de thiazol (3). La viabilité cellulaire observée est comparée à celle du témoin avec solvant (viabilité relative) et utilisée comme estimation du danger potentiel pour les yeux que présente le produit chimique d'essai. Les produits chimiques d'essai sont classés dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP lorsqu'une viabilité cellulaire inférieure ou égale à (≤) 70 % est observée aux deux concentrations testées (5 % et 0,05 %). À l'inverse, les produits chimiques pour lesquels la viabilité cellulaire est supérieure à (>) 70 % aux deux concentrations testées (5 % et 0,05 %) sont classés «sans catégorie» selon le système SGH/le règlement CLP.

4. Dans la présente méthode d'essai, le terme «produit chimique d'essai» désigne ce qui est testé et ne fait pas référence à l'applicabilité de la méthode STE pour les essais sur des substances et/ou mélanges. Les définitions sont données à l'appendice 1.

REMARQUES PRELIMINAIRES ET LIMITES

5. La présente méthode d'essai est basée sur un protocole expérimental mis au point par Kao Corporation (4). Ce protocole a fait l'objet de deux études de validation différentes: l'une par le Comité de validation de la Société japonaisepour les méthodes alternatives aux expérimentations animales (JSAAE) (5), l'autre par le Centre japonais de validation des méthodes alternatives (JaCVAM) (6). Un examen par les pairs a été conduit par le NICEATM/ICCVAM sur la base des rapports des études de validation et des documents de référence (BRD) relatifs à la méthode d'essai (7).

6. Lors de l'utilisation de la méthode d'essai STE pour l'identification de produits chimiques (substances et mélanges) pouvant provoquer de graves lésions oculaires (Catégorie 1 du SGH de l'ONU (1)/du règlement CLP), les données obtenues pour 125 produits chimiques (substances et mélanges) ont démontré une précision globale de la méthode de 83 % (104/125), un taux de faux positifs de 1 % (1/86) et un taux de faux négatifs de 51 % (20/39) par comparaison avec les données obtenues avec la méthode *in vivo* sur œil de lapin (7). Le taux de faux négatif observé n'est pas préoccupant dans le contexte de cet essai, étant donné que tous les produits chimiques qui induisent une viabilité cellulaire ≤ 70 % à une concentration de 5 % et > 70 % à une concentration de 0,05 % devront être testés à nouveau à l'aide de méthodes d'essai *in vitro* dûment validées ou, en dernier recours, avec la méthode *in vivo* sur œil de lapin, en fonction des exigences de la réglementation et selon la démarche expérimentale séquentielle fondée sur l'analyse du poids de la preuve actuellement recommandée (1) (8). Ce sont principalement des substances mono-constituant qui ont été testées, même si l'on dispose également d'un nombre limité de données relatives à l'essai de mélanges. La méthode est néanmoins techniquement applicable aux essais de substances multi-constituants et de mélanges. Toutefois, avant d'appliquer la présente méthode d'essai à un mélange pour obtenir des données à des fins réglementaires, il convient de vérifier si et, dans l'affirmative, pourquoi les résultats peuvent être acceptables dans le cadre réglementaire imposé. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé. Aucune autre limite particulière de la méthode d'essai STE n'a été mise en évidence lors de son application pour l'identification de produits chimiques de la catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP. L'application de cette méthode d'essai peut être envisagée pour tester des produits chimiques, une viabilité cellulaire ≤ 70 % aux deux concentrations (5 % et 0,05 %) étant alors considérée comme l'indicateur d'un effet provoquant des lésions oculaires graves qui justifie de classer le produit chimique d'essai dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP sans mener d'essai complémentaire.

▼**M8**

7. Lors de l'utilisation de la méthode d'essai STE pour l'identification de produits chimiques (substances et mélanges) ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave («sans catégorie» du SGH de l'ONU/du règlement CLP), les données obtenues pour 130 produits chimiques (substances et mélanges) ont démontré une précision globale de la méthode de 85 % (110/130), un taux de faux négatifs de 12 % (9/73) et un taux de faux positifs de 19 % (11/57) par comparaison avec les résultats obtenus avec la méthode *in vivo* sur œil de lapin (7). Si l'on exclut des données celles relatives aux substances hautement volatiles et aux substances solides autres que les tensioactifs, la précision globale est de 90 % (92/102), le taux de faux négatifs est de 2 % (1/54) et le taux de faux positifs est de 19 % (9/48) (7). En conséquence, la limite potentielle de la méthode d'essai STE lors d'une utilisation pour l'identification de substances ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave («sans catégorie» du SGH de l'ONU/du règlement CLP) est un taux élevé de faux négatifs pour i) les substances hautement volatiles présentant une pression de vapeur supérieure à 6 kPa et pour ii) les produits chimiques solides (substances et mélanges) en dehors des tensioactifs et mélanges composés uniquement de tensioactifs. Ces produits chimiques sont exclus du domaine d'applicabilité de la méthode d'essai STE (7).

8. Outre les données relatives aux produits chimiques mentionnés aux paragraphes 6 et 7, les ensembles de données générés avec la méthode d'essai STE comprennent des données internes pour 40 mélanges, lesquelles, par comparaison avec les données issues des essais selon la méthode *in vivo* de Draize, démontrent une précision de la méthode de 88 % (35/40), un taux de faux positifs de 50 % (5/10), et un taux de faux négatifs de 0 % (0/30) pour l'analyse de mélanges ne relevant d'aucune classification selon le SGH de l'ONU/le règlement CLP (9). La méthode d'essai STE est donc applicable dans une approche «bottom-up» pour l'identification de mélanges «sans catégorie» dans le SGH de l'ONU/le règlement CLP, à l'exception des mélanges solides autres que ceux composés uniquement de tensioactifs, par extension des limitations applicables aux substances solides exprimées au paragraphe 7. De plus, les mélanges qui contiennent des substances présentant une pression de vapeur supérieure à 6 kPa doivent être analysés avec attention pour éviter toute sous-évaluation et leur cas doit être justifié un à un.

9. La méthode d'essai STE ne peut être utilisée pour l'identification de produits chimiques relevant de la catégorie 2 du SGH de l'ONU/du règlement CLP ou de la catégorie 2A (irritation oculaire) ou 2B (légère irritation oculaire) du SGH de l'ONU, en raison du nombre considérable de produits chimiques de la catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP sous-évalués dans les catégories 2, 2A ou 2B, et de produits chimiques ne relevant d'aucune catégorie du SGH de l'ONU/du règlement CLP surévalués dans les catégories 2, 2A ou 2B (7). Aussi pourrait-il être nécessaire de mener des essais complémentaires avec une autre méthode adaptée.

10. La méthode d'essai STE convient pour des produits chimiques d'essai dissous ou en suspension uniforme pendant au moins 5 minutes dans du sérum physiologique, dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 5 % dans une solution saline, ou dans une huile minérale. La méthode d'essai STE ne convient pas pour des produits chimiques insolubles ou qui ne peuvent pas être en suspension uniforme pendant au moins 5 minutes dans du sérum physiologique, dans du DMSO à 5 % en solution saline, ou dans une huile minérale. L'utilisation d'une huile minérale dans la méthode d'essai STE est possible car il s'agit d'une exposition de courte durée. En conséquence, la méthode d'essai STE convient pour prévoir le potentiel de dangerosité pour les yeux de produits chimiques d'essai insolubles dans l'eau (alcools gras à longue chaine ou cétones, par exemple), à condition que ces produits chimiques soient solubles dans au moins l'un des trois solvants proposés ci-avant (4).

▼M8

11. Dans la présente méthode d'essai, le terme «produit chimique d'essai» désigne ce qui est testé [1] et ne fait pas référence à l'applicabilité de la méthode d'essai STE aux substances et/ou aux mélanges.

PRINCIPE DE L'ESSAI

12. La méthode d'essai STE est un test *in vitro* de cytotoxicité, réalisé sur une monocouche confluente de fibroblastes de cornée de lapin du Statens Seruminstitut (SIRC), cultivés sur des plaques microtitres 96 puits (4). Après 5 minutes d'exposition à un produit chimique d'essai, on détermine quantitativement la cytotoxicité en mesurant, à l'aide du test MTT (4), la viabilité relative des cellules SIRC. L'observation d'une diminution de la viabilité cellulaire est utilisée pour prédire les effets indésirables potentiels pouvant provoquer des lésions oculaires.

13. Il a été signalé que 80 % d'une solution appliquée sur l'œil d'un lapin est excrétée via le sac conjonctival dans les trois à quatre minutes, tandis que plus de 80 % d'une solution appliquée sur l'œil humain est excrétée en une à deux minutes (10). La méthode d'essai STE vise à s'approcher de ces durées d'exposition et prend comme effet mesuré la cytotoxicité pour évaluer les lésions subies par les cellules SIRC après cinq minutes d'exposition au produit chimique d'essai.

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

14. Avant d'utiliser en routine la méthode d'essai STE décrite dans la présente méthode d'essai, les laboratoires doivent démontrer leurs compétences techniques en classant correctement les onze substances recommandées au tableau 1. Ces substances ont été sélectionnées pour représenter l'ensemble de la gamme des réponses correspondant à des lésions oculaires graves ou à une irritation oculaire, sur la base des résultats obtenus *in vivo* avec le test sur œil de lapin (LD 405) et du système de classification SGH de l'ONU/du règlement CLP (1). La disponibilité des substances dans le commerce, l'existence de données de référence *in vivo* de bonne qualité, et l'existence de données de bonne qualité issues de la méthode d'essai STE *in vitro* constituent d'autres critères de sélection (3). Si un des produits chimiques de la liste n'est pas disponible ou si cela se justifie, on pourra utiliser un autre produit chimique pour lequel des données de références acceptables *in vitro* et *in vivo* sont disponibles, à condition de retenir les mêmes critères que ceux retenus dans la présente Ligne directrice.

Tableau 1

Liste des produits chimiques d'épreuve de compétence

Substance	N° CAS	Classe chimique [1]	État physique	Cat. SGH ONU/ CLP *In vivo* [2]	Solvant dans essai STE	Cat. SGH ONU/ CLPSTE
Chlorure de benzalkonium (10 %, aqueux)	8001-54-5	Composé onium	Liquide	Catégorie 1	Solution saline	Catégorie 1
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Éther	Liquide	Catégorie 1	Solution saline	Catégorie 1

[1] En juin 2013, la Réunion conjointe est convenue que, dans la mesure du possible, le terme «produit chimique d'essai » devrait désormais être employé de façon plus cohérente pour désigner ce qui est soumis à l'essai dans les futures méthodes d'essai.

▼**M8**

Substance	N° CAS	Classe chimique (1)	État physique	Cat. SGH ONU/ CLP *In vivo* (2)	Solvant dans essai STE	Cat. SGH ONU/ CLPSTE
Acid Red 92	18472-87-2	Hétérocycle; composé bromé; composé chloré	Solide	Catégorie 1	Solution saline	Catégorie 1
Hydroxyde de sodium	1310-73-2	Alcali; produit chimique inorganique	Solide	Catégorie 1 (3)	Solution saline	Catégorie 1
Butyrolactone	96-48-0	Lactone; hétérocycle	Liquide	Catégorie 2A (Catégorie 2 dans le CLP)	Solution saline	Aucune prédiction ne peut être faite
Octan-1-ol	111-87-5	Alcool	Liquide	Catégorie 2A/ B (4)(Catégorie 2 dans le CLP)	Huile minérale	Aucune prédiction ne peut être faite
Cyclopentanol	96-41-3	Alcool; hydrocarbure, cyclique	Liquide	Catégorie 2A/ B (5) (Catégorie 2 dans le CLP)	Solution saline	Aucune prédiction ne peut être faite
Acétate de 2-éthoxyéthyle	111-15-9	Alcool; éther	Liquide	Sans catégorie	Solution saline	Sans catégorie
Dodécane	112-40-3	Hydrocarbure, acyclique	Liquide	Sans catégorie	Huile minérale	Sans catégorie
Méthylisobutylcétone	108-10-1	Cétone	Liquide	Sans catégorie	Huile minérale	Sans catégorie

▼M8

Substance	N° CAS	Classe chimique (1)	État physique	Cat. SGH ONU/ CLP *In vivo* (2)	Solvant dans essai STE	Cat. SGH ONU/ CLPSTE
Sulfate de 1,1-diméthylguanidine	598-65-2	Amidine; composé du soufre	Solide	Sans catégorie	Solution saline	Sans catégorie

(1) Les classes chimiques ont été déterminées d'après les informations obtenues dans les publications antérieures du NICEATM ou, si celles-ci étaient indisponibles, auprès de la National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH®) (via ChemIDplus® [National Library of Medicine], disponible à l'adresse http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/) et avec la détermination des structures du NICEATM.

(2) Basé sur les résultats obtenus avec le test *in vivo* sur œil de lapin (ligne directrice 405 de l'OCDE) et sur le SGH de l'ONU/le règlement CLP (1)

(3) La classification dans la catégorie 1 est fondée sur le potentiel corrosif pour la peau d'une solution d'hydroxyde de sodium à 100 % (sur la liste des produits chimiques d'épreuve potentiellement corrosifs pour la peau dans la ligne directrice 435 de l'OCDE) et sur les critères de classification en catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP (1).

(4) La classification dans les catégories 2A ou 2B dépend de l'interprétation des critères du SGH de l'ONU pour distinguer ces deux catégories, à savoir que l'on doit constater des effets chez 2 animaux sur 6 ou 4 animaux sur 6 le septième jour pour classer le produit dans la catégorie 2A. Les données *in vivo* sont issues de 2 études menées chacune sur 3 animaux. Dans une étude, des effets étaient encore visibles chez deux des trois animaux le septième jour, d'où le classement en catégorie 2A (11), tandis que dans la seconde étude tous les effets mesurés chez les trois animaux avaient disparu le septième jour, d'où le classement en catégorie 2B (12).

(5) La classification dans les catégories 2A ou 2B dépend de l'interprétation des critères du SGH de l'ONU pour distinguer ces deux catégories, à savoir que l'on doit constater des effets chez 1 animal sur 3 ou 2 animaux sur 3 le septième jour pour classer le produit dans la catégorie 2A. L'étude *in vivo* a été menée sur 3 animaux. Tous les effets, sauf l'opacité de la cornée et la rougeur conjonctivale chez un animal, avaient disparu le septième jour ou avant. L'animal dont les effets n'avaient pas disparu le septième jour présentait un score d'opacité cornéenne de 1 et un score pour la rougeur conjonctivale de 1 le septième jour, et les deux effets avaient disparu au quatorzième jour (11).

Abréviations: Numéro CAS = Numéro d'enregistrement auprès du *Chemical Abstracts Service*

PROCÉDURE

Préparation de la monocouche cellulaire

15. La lignée cellulaire de cornée de lapin SIRC est utilisée dans la méthode d'essai STE. Il est recommandé d'acquérir les cellules SIRC auprès d'une banque de cellules reconnue, par exemple la lignée CCL60 auprès de l'*American Type Culture Collection*.

16. Les cellules SIRC sont cultivées à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5 % CO_2, dans un flacon contenant un milieu de culture constitué de milieu essentiel minimal d'Eagle (MEM) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fétal (SVF), 2 mM de L-glutamine, 50-100 unités/ml de pénicilline et 50-100 µg/ml de streptomycine. Les cellules devenues confluentes dans le flacon de culture doivent être séparées à l'aide d'une solution de trypsine-acide éthylènediaminetétraacétique, avec ou sans raclette. Les cellules sont repiquées dans un flacon de culture (par exemple, 2 ou 3 repiquages) avant d'être utilisées dans les tests de routine et ne doivent pas être utilisées après plus de 25 repiquages après décongélation.

17. Les cellules prêtes à être utilisées dans l'essai STE sont préparées à la densité adaptée et ensemencées dans une plaque microtitre 96 puits. La densité d'ensemencement recommandée est de $6{,}0 \times 10^3$ cellules par puits lorsque les cellules sont utilisées quatre jours après l'ensemencement, ou $3{,}0 \times 10^3$ cellules par puits lorsque les cellules sont utilisées cinq jours après l'ensemencement, pour un volume de culture de 200 µl. Les cellules utilisées dans le test STE ensemencées dans un milieu de culture à la densité adéquate atteignent une confluence supérieure à 80 % au moment de l'essai, c'est-à-dire quatre ou cinq jours après l'ensemencement.

Application des produits chimique d'essai et des substances témoins

18. Il est recommandé de commencer par dissoudre ou suspendre le produit chimique d'essai dans du sérum physiologique. Si le produit chimique d'essai est peu soluble, insoluble ou ne peut pas être mis en suspension

▼M8

uniforme pendant au moins 5 minutes dans du sérum physiologique, du DMSO à 5 % (N°CAS 67-68-5) dans une solution saline peut alors être choisi comme solvant. Si le produit chimique ne peut être dissous ou mis en suspension uniforme pendant 5 minutes, soit dans du sérum physiologique, soit dans du DMSO à 5 % dans une solution saline, le troisième solvant possible est une huile minérale (N°CAS 8042-47-5).

19. Les produits chimiques d'essai sont dissous ou uniformément suspendus à une concentration de 5 % (m/v) dans le solvant choisi, puis une série de dilutions de facteur 10 est réalisée jusqu'à obtention de concentration à 0,5 % et 0,05 %. Chaque produit chimique est testé aux deux concentrations (5 % et 0,05 %). Les cellules cultivées sur la plaque 96 puits sont exposées à 200 µl/puits de la solution (ou suspension) de produit chimique à 5 %, ou à 0,05 %, pendant 5 minutes à température ambiante. Les produits chimiques (substances mono-constituant, ou substances ou mélanges multi-constituants) sont considérés comme purs et dilués ou suspendus selon la présente méthode, quel que soit leur degré de pureté.

20. Le milieu de culture décrit au paragraphe 16 est utilisé comme témoin pour chaque plaque de chaque répétition. En outre, les cellules sont aussi exposées, pour chaque plaque de chaque répétition, à des échantillons témoins de solvant. Il a été confirmé que les solvants indiqués au paragraphe 18 n'ont aucun effet indésirable sur la viabilité des cellules SIRC.

21. Dans la méthode d'essai STE, du laurylsulfate de sodium (SLS) à 0,01 % dans une solution physiologique est utilisé comme témoin positif pour chaque plaque de chaque répétition. Afin de calculer la viabilité cellulaire en présence du témoin positif, chaque plaque de chaque répétition comprend aussi un témoin avec une solution physiologique.

22. Un blanc est nécessaire afin de déterminer la compensation de densité optique par la solution tampon, et ne contient que le tampon phosphate en solution physiologique, sans calcium ni magnésium (PBS-) ni cellule.

23. Chaque échantillon (produit chimique d'essai à 5 % ou 0,05 %, témoin avec milieu, témoin avec solvant et témoin positif) est testé avec trois réplicats pour chaque répétition, en exposant les cellules à 200 µl du produit chimique approprié (d'essai ou témoin) pendant cinq minutes à température ambiante.

24. Des substances étalons peuvent s'avérer utiles pour évaluer le potentiel d'irritation oculaire de produits chimiques inconnus relevant de classes spécifiques de substances chimiques ou de produits, ou encore pour évaluer le potentiel d'irritation relatif d'un irritant oculaire dans une gamme spécifique de réactions d'irritation.

Mesures de la viabilité cellulaire

25. Après l'exposition, les cellules sont rincées deux fois dans 200 µl de PBS, puis 200 µl de solution MTT (0,5 mg MTT/ml de milieu de culture) sont ajoutés. Après deux heures de réaction dans un incubateur (37 °C, 5 % CO_2), la décantation de la solution de MTT est effectuée, le MTT formazan est extrait par l'ajout de 200 µl de 40 mM isopropanol-acide chlorhydrique pendant 60 minutes dans le noir à température ambiante, et l'absorbance de la solution de MTT formazan est mesurée à 570 nm avec un lecteur de plaque. Il n'y a interférence entre le produit chimique d'essai et le MTT (due à des colorants ou à des réducteurs directs du MTT) que si une quantité significative de produit chimique d'essai perdure dans le système d'essai après le rinçage, ce qui est le cas avec la cornée humaine reconstituée en 3D ou avec les tissus de l'épiderme humain reconstitués, mais est sans incidence pour les cultures cellulaires en 2D utilisées dans la méthode d'essai STE.

▼M8

Interprétation des résultats et modèle de prévision

26. Les valeurs de densité optique (DO) obtenues pour chaque produit chimique d'essai sont ensuite utilisées pour calculer la viabilité cellulaire exprimée relativement à celle du témoin avec solvant, fixée à 100 %. La viabilité cellulaire relative est exprimée en pourcentage et obtenue en divisant la DO du produit chimique d'essai par la DO du témoin avec solvant, après soustraction de la DO du blanc de chaque valeur.

$$Viabilité\ cellulaire(\%) = \frac{(OD_{570}\ produit\ chimique\ d'essai) - (OD_{570}\ blanc)}{(OD_{570}\ témoin\ avec\ solvant) - (OD_{570}\ of\ blanc)} \times 100$$

De même, la viabilité cellulaire de chaque témoin avec solvant est exprimée en pourcentage et s'obtient en divisant la DO de chaque témoin avec solvant par la DO du témoin avec milieu, après soustraction de la DO du blanc de chaque valeur.

27. Trois répétitions indépendantes, chacune contenant trois réplicats (soit 9 puits), sont réalisées. On utilise la moyenne arithmétique des trois puits pour chaque produit chimique d'essai et chaque témoin de solvant dans chaque répétition indépendante pour calculer la moyenne arithmétique de la viabilité cellulaire relative. La moyenne arithmétique finale de la viabilité cellulaire est calculée à partir des trois répétitions indépendantes.

28. Les valeurs seuils de la viabilité cellulaire pour l'identification des produits chimiques testés induisant des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP) ou ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave («Sans catégorie» du SGH de l'ONU/du règlement CLP) sont fournies ci-après.

Tableau 2

Modèle de prédiction de la méthode d'essai STE

Viabilité cellulaire		Classification SGH ONU/CLP	Applicabilité
À 5 %	À 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Sans Categorie	Substances et mélanges, à l'exception: i) des substances hautement volatiles présentant une pression de vapeur supérieure à 6 kPa ([1]) et ii) des produits chimiques (substances et mélanges) solides sauf les tensioactifs et les mélanges composés uniquement de tensioactifs
≤ 70%	> 70 %	Aucune prédiction ne peut être faite	Non applicable
≤ 70%	≤ 70%	Categorie 1	Substances et mélanges ([2])

([1]) Les mélanges contenant des substances présentant une pression de vapeur supérieure à 6kPa doivent être analysés avec attention pour éviter toute sous-évaluation, et leur cas doit être justifié un à un.

([2]) Sur la base de résultats obtenus principalement avec des substances mono-constituant, bien que des données limitées soient aussi disponibles pour les essais portant sur des mélanges. L'utilisation de la méthode d'essai est néanmoins techniquement possible pour les substances multi-constituants et pour les mélanges. Cependant, avant d'utiliser la présente méthode d'essai pour un mélange dans le but de générer des données à des fins réglementaires, il convient de vérifier si, et dans l'affirmative pourquoi, cette méthode fournit des résultats adéquats pour l'utilisation souhaitée. Cette vérification n'est pas nécessaire lorsque les essais sur les mélanges sont exigés par la réglementation.

▼M8

Critères d'acceptabilité

29. L'acceptabilité des résultats de l'essai repose sur les critères suivants:

a) La densité optique du témoin avec milieu (exposé au milieu de culture) est supérieure ou égale à 0,3 après soustraction de la densité optique du blanc.

b) La viabilité du témoin avec solvant est supérieure ou égale à 80 % par rapport à celle du témoin avec milieu. Lorsque plusieurs témoins avec solvant sont utilisés à chaque répétition, chacun de ces témoins devra démontrer une viabilité cellulaire supérieure à 80 % pour qualifier les produits chimiques quand ceux-ci ont été testés avec ces solvants.

c) La viabilité cellulaire obtenue avec le témoin positif (0,01 % SLS) est comprise dans un intervalle de deux écarts-types de la moyenne historique. Les limites d'acceptabilité supérieure et inférieure pour le témoin positif sont régulièrement mises à jour, tous les trois mois ou à chaque fois qu'un essai acceptable est mené dans des laboratoires conduisant peu fréquemment (c'est-à-dire moins d'une fois par mois) ce type d'étude. Lorsqu'un laboratoire n'a pas réalisé un nombre suffisant d'expériences pour établir une distribution de témoins positifs statistiquement robuste, il est acceptable d'utiliser les limites d'acceptabilité supérieure et inférieure établies au moment de la mise au point de la méthode – soit entre 21,1 % et 62,3 % d'après les données expérimentales historiques – et de déterminer la distribution interne au cours des premiers tests de routine.

d) L'écart-type de la viabilité cellulaire finale pour le produit chimique d'essai, issu de trois répétitions indépendantes, est inférieur à 15 % pour les deux concentrations, 5 % et 0,05 %.

Si l'un de ces critères au moins n'est pas rempli, les résultats sont tenus pour non valides et trois répétitions indépendantes supplémentaires doivent être menées.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

30. Les données de chaque puits (les valeurs de viabilité cellulaire, par exemple) pour chaque répétition, ainsi que la moyenne générale, l'écart-type et la classification doivent être rapportés.

Rapport d'essai

31. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Produit chimique d'essai et substances témoins

— Substance mono-constituant: identification chimique, telle que désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChi, formule structurale, et/ou autres identifiants;

— Substance multi-constituants, UVCB et mélange: caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;

— État physique, volatilité, pH, LogP, poids moléculaire, classe chimique et autres propriétés physico-chimiques pertinentes pour la conduite de l'essai, selon les données disponibles;

▼**M8**

— Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc;

— Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);

— Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Conditions d'application et mode opératoire de la méthode d'essai

— Nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude;

— Description de la méthode d'essai utilisée;

— Lignée cellulaire utilisée et source, nombre de repiquages et degré de confluence des cellules utilisées pour l'essai;

— Détails de la procédure d'essai utilisée;

— Nombre de répétitions et de réplicats utilisés;

— Concentrations de produit chimique d'essai utilisées (si différente des recommandations);

— Justification du choix de solvant pour chaque produit chimique d'essai;

— Durée d'exposition au produit chimique d'essai (si différente des recommandations);

— Description de toutes modifications apportées au mode opératoire;

— Description des critères d'évaluation et de décision appliqués;

— Référence à la moyenne et à l'écart-type historiques du témoin positif;

— Démonstration de la compétence du laboratoire dans l'application de la méthode d'essai (en testant les substances d'épreuve, par exemple) ou démonstration de performances adéquates répétées dans l'application de la méthode d'essai.

Résultats

— Pour chaque produit chimique d'essai et substance témoin, et chaque concentration testée, un tableau présente les valeurs de DO individuelles obtenues pour chaque puits (réplicat), la moyenne arithmétique des valeurs de DO pour chaque répétition indépendante, le pourcentage (%) de viabilité cellulaire pour chaque répétition indépendante, ainsi que la moyenne arithmétique finale du pourcentage (%) de viabilité cellulaire et l'écart-type pour les trois répétitions;

— Résultats pour le témoin avec milieu, le témoin avec solvant et le témoin positif démontrant que les critères d'acceptabilité pour l'étude sont remplis;

— Description des autres effets observés;

— Classification globale obtenue compte tenu du modèle de prédiction / des critères de décision utilisés.

▼**M8**

Discussion des résultats

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

(1) ONU. (2013). Système Général Harmonisé de Classification et d'Etiquetage des Produits Chimiques (SGH), Cinquième édition révisée, New York & Genève: Publications des Nations Unies. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponible à l'adresse: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_f.html.

(2) Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

(3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760-770.

(5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.

(6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, pp.1855-1869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Available at: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Chapitre B.5 de la présente annexe, Effet irritant/corrosif aigu sur les yeux.

(9) Saito K, *et al*. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

(10) Mikkelson TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm*. Sci.1648-1653.

(11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brussels, Belgium.

(12) Gautheron P, *et al*. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. Fundam Appl *Toxicol.* 18, 442–449.

(13) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 34). Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(14) OCDE (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N°263). Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

▼**M8**

Appendice

DÉFINITIONS

Précision: degré de conformité entre les résultats d'une méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un de ses aspects de pertinence. Ce terme et le terme «concordance» sont souvent utilisés indifféremment pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (13).

Substance étalon: substance utilisée comme référence dans une comparaison avec un produit chimique d'essai. Une substance étalon doit présenter les propriétés suivantes: (i) provenir d'une ou de plusieurs sources constantes et fiables;; (ii) présenter une similitude structurale et fonctionnelle avec la classe des substances soumises à l'essai;; (iii) posséder des caractéristiques physiques/chimiques connues; (iv) être accompagnée de données confirmant ses effets connus; et (v) avoir une activité connue dans la fourchette des réponses désirées.

Approche «bottom-up»: approche en plusieurs étapes appliquée à un produit chimique présumé ne pas nécessiter de classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, et dont la première étape consiste à distinguer les produits chimiques ne relevant d'aucune classification (résultat négatif) des autres produits chimiques (résultat positif).

Produit chimique: substance ou mélange.

Irritation oculaire: modification de l'œil provoquée par l'application d'un produit chimique d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui est totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application. Interchangeable avec «Effets réversibles sur l'œil» et avec «Catégorie 2 du SGH de l'ONU/du règlement CLP».

Taux de faux négatifs: proportion de produits chimiques positifs faussement identifiés comme négatifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Taux de faux positifs: proportion de produits chimiques négatifs faussement identifiés comme positifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Danger: propriété inhérente d'un agent ou d'une situation susceptible de provoquer des effets néfastes lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-)population est exposé(e) à cet agent.

Témoin avec milieu: réplicat non traité contenant tous les composants d'un système d'essai. Cet échantillon subit les mêmes procédures que les échantillons témoins traités ou non avec le produit chimique d'essai afin de déterminer si le solvant interagit avec le système d'essai.

Mélange: mélange ou solution composé de deux substances ou plus.

Substance mono-constituant: Substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un constituant principal est présent à une concentration d'au moins 80 % (P/P).

MTT: bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, bromure de tétrazolium.

Substance multi-constituants: Substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant principal est présent à une concentration comprise entre 10 % et 80 % (P/P). Une substance multi-constituants résulte d'un processus de fabrication. La différence entre un mélange et une substance multi-constituants est que le mélange est obtenu en associant deux substances ou plus sans réaction chimique. Une substance multi-constituants résulte d'une réaction chimique.

▼**M8**

DO: densité optique.

Témoin positif: réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai et traité avec une substance induisant notoirement une réponse positive. Pour permettre d'évaluer la variabilité de la réponse du témoin positif dans le temps, l'ampleur de la réponse positive ne doit pas être excessive.

Pertinence: description de la relation entre l'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité à des fins spécifiques. Elle définit le degré auquel l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (10).

Fiabilité: mesure dans laquelle la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires ainsi que la répétabilité intra-laboratoire (13).

Sensibilité: proportion des substances positives/actives correctement classées par l'essai. Il s'agit d'une mesure de la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriels, et d'un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (10).

Lésion oculaire grave: lésion des tissus oculaires ou dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'un produit chimique d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui n'est pas totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application. Interchangeable avec «Effets irréversibles sur l'œil» et avec «Catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP».

Témoin avec solvant/véhicule: échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, y compris le solvant ou véhicule utilisé pour tester les échantillons témoins, traités ou non avec le produit chimique d'essai, afin de déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique d'essai dissous dans le même solvant ou véhicule. Testé simultanément avec un témoin avec milieu, cet échantillon indique également si le solvant ou véhicule interagit avec le système d'essai.

Spécificité: proportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont correctement classés par l'essai. Il s'agit d'une mesure de la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriels, et d'un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (13)

Substance: un élément chimique et ses composés à l'état naturel ou obtenus par un processus de fabrication, y compris tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit et toute impureté résultant du processus mis en œuvre, mais à l'exclusion de tout solvant pouvant être séparé de la substance sans en affecter la stabilité ni modifier la composition.

Tensioactif: Aussi appelé agent de surface; il s'agit d'un produit chimique, tel qu'un détergent, capable de réduire la tension superficielle d'un liquide et de favoriser ainsi sa capacité à mousser ou à pénétrer les solides; il est aussi connu comme agent mouillant.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai«».

▼M8

Stratégie d'essais à plusieurs niveaux: démarche expérimentale séquentielle consistant à examiner toutes les informations existantes sur un produit chimique d'essai dans un ordre déterminé, en ayant recours à chaque étape à un processus d'analyse du poids de la preuve afin de déterminer si les informations disponibles sont suffisantes pour décider d'une classification dans une catégorie de danger, avant de passer à l'étape suivante. Si le potentiel d'irritation d'un produit chimique d'essai peut être déterminé sur la base des informations existantes, aucun essai supplémentaire n'est nécessaire. Dans le cas contraire, une procédure expérimentale progressive de type séquentiel sur des animaux est alors lancée jusqu'à ce qu'une classification sans équivoque puisse être effectuée.

Approche «top-down»: approche en plusieurs étapes appliquée à un produit chimique d'essai présumé provoquer des lésions oculaires graves, et dont la première étape consiste à distinguer les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves (résultat positif) des autres produits chimiques (résultat négatif).

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques): système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans le but de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (1).

Catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP: voir «Lésions oculaires graves».

Catégorie 2 du SGH de l'ONU/du règlement CLP: voir «Irritation oculaire».

Sans catégorie selon le SGH de l'ONU/le règlement CLP: produit chimique qui n'est pas classé dans la catégorie 1 ou 2 du SGH de l'ONU/du règlement CLP (ou dans la catégorie 2A ou 2B du SGH de l'ONU).

UVCB: substances de composition inconnue ou variable, produits de réactions products complexes ou matériels biologiques.

▼M8

B.69. **MÉTHODE D'ESSAI SUR MODÈLE D'ÉPITHÉLIUM CORNÉEN HUMAIN RECONSTITUÉ (ECHR) POUR L'IDENTIFICATION DE PRODUITS CHIMIQUES NE NÉCESSITANT AUCUNE CLASSIFICATION NI ÉTIQUETAGE POUR IRRITATION OCULAIRE OU LÉSIONS OCULAIRES GRAVES**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 492 (2017) de l'OCDE. Une *lésion oculaire grave* est une lésion des tissus oculaires ou une dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'un produit chimique d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui n'est pas totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application, selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU) (1) et du règlement (CE) n° 1272/2008 de l'Union européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (ci-après le «règlement CLP») ([1]). Toujours selon le SGH de l'ONU et le règlement CLP, une *irritation oculaire* est définie comme la production de changements dans l'œil suite à l'application d'un produit chimique d'essai sur la surface antérieure de l'œil et qui sont totalement réversibles dans les 21 jours suivant l'application. Les produits chimiques d'essai provoquant des lésions oculaires graves sont classés dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU et du règlement CLP, tandis que ceux provoquant une irritation oculaire sont classés dans la catégorie 2 du SGH/du CLP. Les produits chimiques d'essai non classés pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave sont définis comme ne répondant pas aux critères de classification des catégories 1 ou 2 (2A ou 2B) du SGH de l'ONU et du CLP; autrement dit, ils sont considérés comme ne relevant d'aucune catégorie du SGH de l'ONU/du CLP («sans catégorie»).

2. Jusqu'à présent, l'évaluation des lésions oculaires graves/irritations oculaires impliquait généralement le recours à des animaux de laboratoire [méthode d'essai B.5;(2)]. Le choix de la méthode d'essai la plus pertinente et l'utilisation de cette méthode d'essai doivent être envisagés dans le contexte du Document d'orientation de l'OCDE sur les Approches Intégrées sur les Essais et l'Évaluation pour les lésions oculaires sévères et l'irritation de l'œil (39).

3. La présente méthode d'essai décrit une procédure *in vitro* permettant l'identification de produits chimiques (substances et mélanges) ne relevant d'aucune classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves, conformément au SGH de l'ONU et au règlement CLP. Un modèle d'épithélium cornéen humain reconstitué (EChR) est utilisé, qui reproduit fidèlement les propriétés histologiques, morphologiques, biochimiques et physiologiques de l'épithélium cornéen humain. Quatre autres méthodes d'essai *in vitro* ont été validées, considérées scientifiquement valides et adoptées en tant que méthodes d'essai B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) et B.68 (6), à utiliser pour évaluer le danger de lésions oculaires graves/d'irritation oculaire chez l'humain.

4. Deux essais validés sont inclus dans la présente méthode d'essai. Ils font appel à un un modèle tissulaire d'EChR disponible dans le commerce. Le test d'irritation oculaire (TIO) EpiOcular™ et le TIO SkinEthic™ avec épithélium cornéen humain (HCE) ont été validés dans des études d'évaluation de l'irritation oculaire/lésions oculaires graves (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13). Ces deux essais utilisent comme système d'essai un modèle tissulaire d'EChR disponible dans le commerce et sont désignés ci-après en tant

([1]) Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006, JO L 353 du 31.12.2008, p. 1.

▼**M8**

méthodes de référence validées (MRV1 et MRV2, respectivement). D'après les études de validation et l'examen indépendant par des pairs dont ils ont fait l'objet (9)(12), le TIO EpiOcular™ et le TIO HCE SkinEthic™ sont capables d'identifier correctement des produits chimiques (substances et mélanges) ne relevant d'aucune classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves selon le SGH de l'ONU, et les essais ont été jugés scientifiquement valides et recommandés pour cet objectif (13).

5. Il est généralement admis que dans notre horizon de prévision, aucun essai unique d'irritation oculaire *in vitro* ne pourra remplacer complètement le test oculaire *in vivo* de Draize (2)(14) pour établir le degré d'irritation oculaire provoqué par les différentes classes de produits chimiques. Cependant, la combinaison de plusieurs méthodes de substitution dans le cadre d'une stratégie d'essais (à plusieurs niveaux) telle que l'approche «bottom-up/top-down» pourrait remplacer le test de Draize (15). L'approche «bottom-up» (15) est conçue pour être appliquée quand, au vu des informations existantes, un produit chimique devrait a priori ne causer aucune irritation oculaire suffisante pour nécessiter une classification, tandis que l'approche «top-down» (15) est indiquée lorsque, d'après les informations existantes, on s'attend à ce qu'un produit chimique provoque des lésions oculaires graves. Le TIO EpiOcular™ et le TIO HCE SkinEthic™ sont recommandés pour identifier sans expérimentation supplémentaire les produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves selon le SGH de l'ONU/le règlement CLP («sans catégorie»), dans le cadre d'une approche «bottom-up/top-down» suggérée par Scott *et al.*, par exemple comme première étape d'une approche «bottom-up» ou comme une des étapes finales dans une approche «top-down» (15). Cependant, le TIO EpiOcular™ et le TIO HCE SkinEthic™ ne sont pas conçus pour permettrede faire la distinction entre les produits chimiques de catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP (lésions oculaires graves) et ceux de catégorie 2 du SGH de l'ONU/du règlement CLP (irritation oculaire). Cette distinction doit être faite à une autre étape d'une stratégie par niveaux (15). Un produit chimique identifié comme nécessitant une classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves à l'aide du TIO EpiOcular™ ou du TIO HCE SkinEthic™ devrait être soumis à des essais complémentaires (*in vitro* et/ou *in vivo*) visant à tirer une conclusion définitive («sans catégorie», catégorie 1 ou catégorie 2 selon le SGH de l'ONU/le règlement CLP), en utilisant les méthodes d'essai B.47, B.48, B.61 ou B.68, par exemple.

6. L'objectif de la présente méthode d'essai est de décrire les procédures utilisées pour évaluer le danger potentiel qu'un produit chimique d'essai présente pour l'œil en se fondant sur sa capacité à provoquer une cytotoxicité sur un modèle tissulaire d'EChR, mesurée avec le test MTT (16) (voir paragraphe 21). La viabilité du tissu d'EChR après exposition à un produit chimique d'essai est déterminée par comparaison avec celle de tissus traités avec la substance servant de témoin négatif (% de viabilité) puis utilisée pour prédire le danger potentiel du produit chimique d'essai pour les yeux.

7. Des normes de performance (17) permettent de simplifier la validation d'essais *in vitro* nouveaux ou modifiés utilisant l'EChR et similaires au TIO EpiOcular™ et au TIO HCE SkinEthic™, conformément aux principes énoncés dans le Document d'orientation n°34 (18), et de modifier rapidement la ligne directrice 492 pour y intégrer lesdits essais. L'acceptation mutuelle des données (AMD) conformément à l'accord de l'OCDE ne sera garantie pour les essais validés selon les normes de performance que si ces essais ont été examinés et incorporés dans la ligne directrice correspondante par l'OCDE.

DÉFINITIONS

8. Les définitions sont données à l'appendice 1.

▼**M8**

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

9. La présente méthode d'essai se base sur un modèle tissulaire tridimensionnel d'EChR disponible dans le commerce et produit à partir de kératinocytes primaires de l'épiderme humain (le modèle EpiOcular™ OCL-200), ou à partir de cellules épithéliales cornéennes humaines immortalisées (le TIO HCE/S SkinEthic™). Les modèles tissulaires d'EChR EpiOcular™ OCL-200 et HCE/S SkinEthic™ sont fidèles à la structure tridimensionnelle de l'épithélium cornéen *in vivo* et produits à partir de cellules de l'espèce cible (19)(20). En outre, ces essais mesurent directement la cytotoxicité due à la pénétration transcornéenne du produit chimique et la production de lésions cellulaires et tissulaires après exposition de l'œil à un produit chimique, ce qui permet d'évaluer la réponse globale d'irritation oculaire/de lésion oculaire grave *in vivo*. Les lésions cellulaires peuvent être causées par plusieurs mécanismes d'action (voir paragraphe 20), mais la cytotoxicité joue un rôle mécanique majeur, sinon le rôle principal, dans l'ampleur de la réponse globale de lésion oculaire grave/d'irritation oculaire après exposition à un produit chimique, réponse qui se manifeste *in vivo* principalement par l'opacité cornéenne, l'iritite, la rougeur et/ou le chémosis conjonctivaux, quels que soient les processus physico-chimiques sous-jacents des lésions tissulaires.

10. Un large éventail de produits chimiques, représentant de nombreux types et classes chimiques, poids moléculaires, LogP, structures chimiques, etc., a été testé dans l'étude de validation sur laquelle s'appuie la présente méthode d'essai. La base de données de validation du TIO EpiOcular™ comprenait un total de 113 produits chimiques, couvrant 95 groupes fonctionnels organiques différents d'après une analyse de l'OCDE effectuée à l'aide de la boîte à outils QSAR (8). La majorité de ces produits chimiques étaient des substances mono-constituant, mais plusieurs substances multi-constituants étaient aussi incluses dans l'étude (dont 3 homopolymères, 5 copolymères et 10 quasi-polymères). Concernant les états physiques et les catégories selon le SGH de l'ONU/le règlement CLP, les 113 produits chimiques d'essai étaient répartis comme suit: 13 liquides de catégorie 1, 15 solides de catégorie 1, 6 liquides de catégorie 2A, 10 solides de catégorie 2A, 7 liquides de catégorie 2B, 7 solides de catégorie 2B, 27 liquides sans catégorie et 28 solides sans catégorie (8). La base de données de validation du TIO HCE SkinEthic™ comprenait un total de 200 produits chimiques, couvrant 165 groupes fonctionnels organiques différents d'après une analyse de l'OCDE effectuée à l'aide de la boîte à outils QSAR (8)(10)(11). La majorité de ces produits chimiques étaient des substances mono-constituant, mais plusieurs substances multi-constituants étaient aussi incluses dans l'étude (dont 10 polymères). Concernant les états physiques et les catégories selon le SGH de l'ONU/le règlement CLP, les 200 produits chimiques d'essai étaient répartis comme suit: 27 liquides de catégorie 1, 24 solides de catégorie 1, 19 liquides de catégorie 2A, 10 solides de catégorie 2A, 9 liquides de catégorie 2B, 8 solides de catégorie 2B, 50 liquides sans catégorie et 53 solides sans catégorie (10)(11).

11. La présente méthode d'essai peut être utilisée pour tester des produits chimiques (substances et mélanges) solides, liquides, semi-solides et sous forme de cires. Les liquides peuvent être aqueux ou non; les solides peuvent être solubles ou insolubles dans l'eau. Si possible, les solides sont moulus finement avant application; aucun autre prétraitement de l'échantillon n'est nécessaire. Les gaz et aérosols n'ont pas fait l'objet d'une étude de validation. Bien qu'il soit envisageable de pouvoir tester des gaz et des aérosols en faisant appel à l'EChR, l'actuelle méthode d'essai ne permet pas de tester les produits de ce type.

12. Les produits chimiques d'essai qui absorbent la lumière à la même longueur d'onde que le formazan bleu (naturellement ou après traitement) et les produits chimiques d'essai pouvant directement réduire le colorant vital MTT (en formazan) peuvent interférer avec les mesures de la viabilité tissulaire et nécessitent l'utilisation de témoins adaptés pour corriger l'essai en fonction de ces interférences. Le type de témoins adaptés nécessaire dépendra du type d'interférence que présente le produit chimique d'essai et de la procédure employée pour mesurer quantitativement le formazan (voir paragraphes 36-42).

▼**M8**

13. Les résultats issus des études de pré-validation (21)(22) et de validation complète (8)(10)(11) ont démontré que le TIO EpiOcular™ et le TIO HCE SkinEthic™ peuvent être menés par des laboratoires n'ayant jamais réalisé cet essai auparavant et qu'ils sont reproductibles au sein des laboratoires et entre laboratoires. D'après ces études, sur la base des données relatives à 113 produits chimiques, le taux de reproductibilité attendu pour le TIO EpiOcular™ en matière de concordance des prédictions est de l'ordre de 95 % au sein des laboratoires et de 93 % entre laboratoires. Sur la base de données relatives à 120 produits chimiques, le taux de reproductibilité attendu pour le TIO HCE SkinEthic™ en matière de concordance des prédictions est de l'ordre de 92 % au sein des laboratoires et de 95 % entre laboratoires.

14. Le TIO EpiOcular™ peut être employé pour identifier les produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves au titre du SGH de l'ONU et du règlement CLP. D'après les données obtenues dans l'étude de validation (8), le TIO EpiOcular™ présente une précision globale de 80 % (sur 112 produits chimiques), une sensibilité de 96 % (sur 57 produits chimiques), un taux de faux négatifs de 4 % (sur 57 produits chimiques), une spécificité de 63 % (sur 55 produits chimiques) et un taux de faux positifs de 37 % (sur 55 produits chimiques) par comparaison avec les données de référence obtenues avec le test *in vivo* sur œil de lapin (méthode d'essai B.5) (2)(14) et classées selon le SGH de l'ONU et le règlement CLP. Dans une étude testant 97 formulations liquides de produits agrochimiques, une performance similaire à celle démontrée dans l'étude de validation a été obtenue avec la méthode du TIO EpiOcular™ pour ce type de mélanges (23). Les 97 formulations étaient réparties comme suit: 21 en catégorie 1, 19 en catégorie 2A, 14 en catégorie 2B et 43 sans catégorie, selon le SGH de l'ONU (1) et sur la base des données de référence obtenues avec le test *in vivo* sur œil de lapin (méthode d'essai B.5) (2)(14). Une précision globale de 82 % (sur 97 formulations), une sensibilité de 91 % (sur 54 formulations), un taux de faux négatifs de 9 % (sur 54 formulations), une spécificité de 72 % (sur 43 formulations) et un taux de faux positifs de 28 % (sur 43 formulations) ont été obtenus (23).

15. Le TIO HCE SkinEthic™ peut être employé pour identifier les produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves au titre du SGH de l'ONU et du règlement CLP. D'après les données obtenues dans l'étude de validation (10)(11), le TIO HCE SkinEthic™ présente une précision globale de 84 % (sur 200 produits chimiques), une sensibilité de 95 % (sur 97 produits chimiques), un taux de faux négatifs de 5 % (sur 97 produits chimiques), une spécificité de 72 % (sur 103 produits chimiques) et un taux de faux positifs de 28 % (sur 103 produits chimiques) par comparaison avec les données de référence obtenues avec le test *in vivo* sur œil de lapin (méthode d'essai B.5) (2)(14) et classées selon le SGH de l'ONU et le règlement CLP.

16. Les taux de faux négatifs obtenus avec les deux essais sur EChR sont conformes à la probabilité globale qu'au moins 12 % des produits chimiques identifiés comme relevant de la catégorie 2 du SGH de l'ONU et du règlement CLP avec le test de Draize *in vivo* soient également classés «sans catégorie» selon le SGH de l'ONU et le règlement CLP lors de la répétition d'un essai, en raison de la variabilité inhérente de la méthode au cours de l'essai (24). Les taux de faux positifs obtenus avec les deux méthodes d'essai sur EChR pour les substances et les mélanges ne sont pas préoccupants dans le contexte de la présente méthode d'essai, étant donné que tous les produits chimiquesd'essai provoquant une viabilité tissulaire inférieure ou égale aux seuils définis (voir paragraphe 44) feront ensuite l'objet d'autres essais *in vitro* selon d'autres méthodes, ou en dernier recours d'essais chez le lapin, en fonction des exigences de la réglementation, selon une démarche expérimentale séquentielle fondée sur l'analyse du poids de la preuve. Ces méthodes

▼M8

d'essai peuvent être utilisées pour tous les types de produits chimiques, un résultat négatif pouvant être accepté pour ne pas classer un produit chimique pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves («sans catégorie» selon le SGH de l'ONU et le règlement CLP). Il y a lieu de consulter les autorités réglementaires compétentes avant de mettre en œuvre le TIO EpiOcular™ ou le TIO HCE SkinEthic™ dans un système de classification autre que le SGH de l'ONU/le règlement CLP.

17. Une limite de cette méthode d'essai est qu'elle ne permet pas de distinguer les produits chimiques produisant une irritation oculaire ou des effets réversibles sur l'œil (catégorie 2) de ceux entraînant des lésions oculaires graves ou des effets irréversibles sur l'œil (catégorie 1 du SGH de l'ONU et du CLP), ni les produits irritants pour l'œil (catégorie optionnelle 2A) de ceux modérément irritants pour l'œil (catégorie optionnelle 2B), tels que définis dans le SGH de l'ONU (1). Pour établir cette distinction, des essais supplémentaires avec d'autres méthodes d'essai in vitro sont nécessaires.

18. Dans la présente méthode d'essai, le terme «produit chimique d'essai» désigne ce qui est soumis à l'essai ([1]) et ne fait pas référence à l'applicabilité de la méthode EChR pour les essais sur des substances et/ou mélanges.

PRINCIPE DE L'ESSAI

19. Le produit chimique d'essai est appliqué localement sur au moins deux modèles tridimensionnels d'EChR et la viabilité tissulaire est mesurée après l'exposition et une période d'incubation post-traitement. Les tissus d'épithélium cornéen humain sont reconstitués à partir de kératinocytes épidermiques humains primaires, ou à partir de cellules épithéliales cornéennes humaines immortalisées, cultivés pendant plusieurs jours jusqu'à la formation d'un épithélium stratifié, hautement différencié et morphologiquement semblable à l'épithélium cornéen humain. Le modèle tissulaire d'EChR EpiOcular™ est constitué d'au moins trois couches cellulaires viables et d'une surface non kératinisée présentant une structure similaire à celle de la cornée *in vivo*. Le modèle tissulaire d'EChR HCE SkinEthic™ est constitué d'au moins quatre couches cellulaires viables comprenant des cellules basales colonnaires, des cellules amplificatrices transitoires et des cellules superficielles squameuses et présentant une structure similaire à celle de l'épithélium cornéen humain normal (20)(26).

20. Les lésions oculaires graves ou l'irritation oculaire consécutives à l'application d'un produit chimique, qui se manifestent *in vivo* principalement par l'opacité cornéenne, l'iritite et la rougeur et/ou le chémosis conjonctivaux, résultent d'une cascade d'événements débutant par la pénétration du produit chimique à travers la cornée et/ou la conjonctive et la production de lésions cellulaires. Plusieurs mécanismes d'action peuvent provoquer des lésions cellulaires, parmi lesquels: la lyse de la membrane cellulaire (par des tensioactifs ou des solvants organiques, par exemple); la coagulation de macromolécules, notamment les protéines (par des tensioactifs, des solvants organiques, des alcalis et des acides, par exemple); la saponification des lipides (par des alcalis, par exemple); et l'alkylation ou d'autres interactions covalentes avec des macromolécules (par des agents de blanchiment, des peroxydes et des agents alkylants, par exemple) (15)(27)(28). Cependant, il a été démontré que la cytotoxicité joue un rôle mécanique important, sinon le rôle principal, dans l'ampleur de la réponse globale d'irritation oculaire/de lésion oculaire grave après exposition à un produit chimique, quels que soient les processus physico-chimiques sous-jacents des lésions tissulaires (29)(30). En outre, le pouvoir de lésion oculaire grave/d'irritation oculaire d'un produit chimique est déterminé principalement par l'ampleur de la

([1]) En juin 2013, la Réunion conjointe est convenue que, dans la mesure du possible, le terme «produit chimique d'essai » devrait désormais être employé de façon plus cohérente pour désigner ce qui est soumis à l'essai dans les futures lignes directrices nouvelles ou révisées de l'OCDE.

▼**M8**

lésion initiale (31), laquelle est corrélée avec l'étendue de la mort cellulaire (29) et à l'ampleur des effets et conséquences éventuelles qui en découlent (32). Par conséquent, les produits faiblement irritants n'ont en général d'effet que sur l'épithélium superficiel de la cornée, les produits modérément irritants affectent principalement l'épithélium et le stroma superficiel, et les produits gravement irritants provoquent des lésions de l'épithélium, du stroma profond et parfois de l'endothélium cornéen (30)(33). On mesure la viabilité du tissu d'EChR après exposition locale à un produit chimique d'essai afin de distinguer les produits chimiques ne nécessitant pas d'être classés pour les lésions oculaires graves/l'irritation oculaire («sans catégorie» selon le SGH de l'ONU et le règlement CLP) de ceux nécessitant d'être classés et étiquetés (catégories 1 et 2 selon le SGH de l'ONU et le règlement CLP) en partant du principe que tous les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves ou une irritation oculaire présentent un caractère cytotoxique pour l'épithélium cornéen et/ou la conjonctive.

21. La viabilité tissulaire de l'EChR est mesurée via la conversion enzymatique du colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, bromure de tétrazolium; numéro CAS 298-93-1] par les cellules viables du tissu en un sel de formazan bleu mesuré quantitativement après son extraction des tissus (16). Les produits chimiques qui ne relèvent d'aucune classification dans le SGH de l'ONU et le règlement CLP («sans catégorie») sont ceux qui ne provoquent pas une diminution de la viabilité tissulaire en deçà d'un seuil défini (à savoir, viabilité tissulaire > 60 % avec le TIO EpiOcular™ et le TIOL ([1]) HCE SkinEthic™, ou > 50 % avec le TIOS ([2]) HCE SkinEthic™)(voir paragraphe 44).

DEMONSTRATION DES COMPÉTENCES

22. Avant d'appliquer en routine les essais sur EChR à des fins réglementaires, les laboratoires doivent démontrer leurs compétences techniques en classant correctement les quinze produits chimiques d'épreuve recommandés au tableau 1. Ces produits chimiques ont été sélectionnés parmi ceux utilisés lors de l'étude de validation des MRV (8)(10)(11). La sélection comprend, autant que possible, des produits chimiques qui: (i) couvrent plusieurs états physiques; (ii) couvrent la gamme complète des effets *in vivo* de lésion oculaire grave/d'irritation oculaire d'après les données de haute qualité obtenues avec le test de référence *in vivo* sur œil de lapin (méthode d'essai B.5) (2)(14) et selon le système de classification du SGH de l'ONU (catégories 1, 2A, 2B ou «sans catégorie») (1) et le système de classification du règlement CLP (catégories 1, 2 ou «sans catégorie»); (iii) couvrent les différents critères de classification *in vivo* (24)(25); (iv) sont représentatifs des classes chimiques utilisées dans l'étude de validation (8)(10)(11); (v) couvrent un large spectre de groupes fonctionnels organiques (8)(10)(11); (vi) ont une structure chimique bien définie (8)(10)(11); (vii) sont colorés et/ou sont des réducteurs directs du MTT; (viii) ont donné des résultats reproductibles lors de la validation des méthodes d'essai sur EChR; (ix) ont été classés correctement lors de la validation des méthodes d'essai sur EChR; (x) couvrent la gamme complète des réponses *in vitro* d'après des données de haute qualité issues des méthodes d'essai sur EChR (viabilité 0-100 %); (xi) sont disponibles dans le commerce; et (xii) ne sont pas excessivement coûteux à acquérir et/ou éliminer. Lorsque l'un des produits chimiques du tableau n'est pas disponible ou lorsque sa non-utilisation est justifiable, un autre produit chimique remplissant les conditions énoncées ci-avant peut être utilisé, par exemple un des produits chimiques utilisés pour la validation de la MRV. Ces changements doivent cependant être justifiés.

([1]) TIOL: TIO pour les liquides dans le cas du HCE SkinEthic™
([2]) TIOS: TIO pour les solides dans le cas du HCE SkinEthic™

▼M8

Tableau 1

Liste des produits chimiques d'épreuve de compétence

Nom chimique	N° CAS	Groupe fonctionnel organique (1)	État physique	Viabilité MRV1 (%) (2)	Viabilité MRV2 (%) (3)	Prédiction MRV	Réducteur du MTT	Interférence couleur
***In Vivo* Categorie 1** (4)								
Méthylthioglycolate	2365-48-2	Ester d'acide carboxylique; thioalcoolol	L	10,9±6,4	5,5±7,4	Aucune prédiction possible	O (fort)	N
Acrylate d'hydroxyétyle	818-61-1	Acrylate; alcool	L	7,5±4,7 (5)	1,6±1,0	Aucune prédiction possible	N	N
2,5-Diméthyl-2,5-hexanédiol	110-03-2	Acrylate; alcool	S	2,3±0,2	0,2±0,1	Aucune prédiction possible	N	N
Oxalate de sodium	62-76-0	Acide oxocarboxylique	S	29,0±1,2	5,3±4,1	Aucune prédiction possible	N	N
***In Vivo* Catégorie 2A** (4)								
acide D-gluconique, composé avec N,N″-bis(4-chlorophényl)-3,12-diimino-2,4,11,13-tétraazatétradécanediamidine (2:1) (20 %, aqueux) (6)	18472-51-0	Halogénure aromatique hétérocyclique; halogénure d'aryle; groupe dihydroxyle; guanidine	L	4,0±1,1	1,3±0,6	Aucune prédiction possible	N	O (faible)
Benzoate de sodium	532-32-1	Aryle; acide carboxylique	S	3,5±2,6	0,6±0,1	Aucune prédiction possible	N	N
***In Vivo* Catégorie 2B** (4)								
Diéthyl-toluamide	134-62-3	Benzamide	L	15,6±6,3	2,8±0,9	Aucune prédiction possible	N	N
2,2-Diméthyl-3-méthylènebicyclo [2.2.1] heptane	79-92-5	Alcane, ramifié avec carbone tertiaire; alcène; bicycloheptane; composés carbocycliques pontés; cycloalcane	S	4,7±1,5	15,8±1,1	Aucune prédiction possible	N	N
***In Vivo* Sans Catégorie** (4)								
1-Éthyl-3-méthylimidazolium éthylsulfate	342573-75-5	Alcoxyle; sel d'ammonium; aryle; imidazole; sulfate	L	79,9±6,4	79,4±6,2	Sans Cat	N	N

▼M8

Nom chimique	N° CAS	Groupe fonctionnel organique (1)	État physique	Viabilité MRV1 (%) (2)	Viabilité MRV2 (%) (3)	Prédiction MRV	Réducteur du MTT	Interférence couleur
Éther dicaprylyle	629-82-3	alcoxyle; éther	L	97,8±4,3	95,2±3,0	Sans Cat	N	N
Butoxyde de pipéronyle	51-03-6	Alcoxyle; benzodioxole; benzyle; éther	L	104,2±4,2	96,5±3,5	Sans Cat	N	N
Polyéthylène glycol (PEG-40) Huile de ricin hydrogénée	61788-85-0	Acylal; alcool; allyle; éther	Visqueux	77,6±5,4	89,1±2,9	Sans Cat	N	N
1-(4-Chlorophényl)-3-(3,4-dichlorophényl) urée Triclocarban	101-20-2	Halogénure aromatique hétérocyclique; halogénure d'aryle; dérivés de l'urée	S	106,7±5,3	101,9±6,6	Sans Cat	N	N
2,2′-méthylène-bis(6-(2*H*-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)phénol)	103597-45-1	Alcane ramifié avec carbone quaternaire; composé aromatique polycyclique; hétérocycles saturés polycycliques; précurseur de quinone; tert-butyle	S	102,7±13,4	97,7±5,6	Sans Cat	N	N
Tétrafluoroborate de potassium	14075-53-7	Sels inorganiques	S	88,6±3,3	92,9±5,1	Sans Cat	N	N

Abréviations:

N° CAS = Numéro d'enregistrement dans le *Chemical Abstracts Service*; SGH de l'ONU = Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (1); MRV1 = Méthode de référence validée, à savoir le TIO EpiOcular™; MRV2 = Méthode de référence validée, à savoir le TIO HCE SkinEthic™; Interférence couleur = interférence de couleurs avec la mesure de l'absorbance (densité optique, DO) du formazan.

(1) Groupes fonctionnels organiques déterminés d'après une analyse emboîtée de l'OCDE avec la Boîte à outils (3.1) (8).

(2) Sur la base des résultats obtenus avec le TIO EpiOcular™ dans l'étude de validation des méthodes d'évaluation de l'irritation oculaire de l'EURL ECVAM/Cosmetics Europe (8).

(3) Sur la base des résultats obtenus avec le TIO HCE SkinEthic™ dans l'étude de validation (10)(11).

(4) Sur la base des résultats obtenus avec le test *in vivo* sur œil de lapin (méthode d'essai B.5/ligne directrice 405 de l'OCDE) (2)(14) et le SGH de l'ONU.

(5) Sur la base des résultats obtenus avec l'étude suivant la stratégie du CONsortium CEFIC pour les tests d'irritation oculaire *in vitro* (CON4EI).

(6) Classification dans les catégories 2A ou 2B dépend de l'interprétation des critères du SGH de l'ONU pour distinguer ces deux catégories, à savoir que l'on doit constater des effets chez 1 animal sur 3 ou 2 animaux sur 3 le septième jour pour classer le produit dans la catégorie 2A. L'étude *in vivo* a été menée sur 3 animaux. Tous les effets, sauf l'opacité de la cornée chez un animal, avaient disparu le septième jour ou avant. L'animal dont les effets n'avaient pas disparu le septième jour présentait un score d'opacité cornéenne de 1 le septième jour, et l'effet avait disparu au neuvième jour.

23. Dans le cadre de la démonstration des compétences, il est recommandé aux utilisateurs de contrôler les propriétés de barrière des tissus dès réception, comme précisé par le producteur du modèle d'EChR (voir paragraphes 25, 27 et 30). Cette étape est particulièrement importante lorsque les tissus sont transportés sur de longues distances/durées. Lorsqu'unessai a été réalisé avec succès et que le laboratoire en maîtrise l'utilisation et a démontré cette maîtrise, il n'est plus nécessaire de procéder systématiquement à cette vérification. Toutefois, pour les essais utilisés en routine, il est recommandé de continuer à évaluer les propriétés de barrière à intervalles réguliers.

▼M8

PROCÉDURE

24. Les essais actuellement couverts par la présente méthode d'essai sont les tests scientifiquement valides TIO EpiOcular™ et TIO HCE SkinEthic™ (9)(12)(13), désignés en tant que Méthodes de référence validées (MRV1 et MRV2, respectivement). Les modes opératoires de référence pour les méthodes EChR sont disponibles et doivent être suivis lors de la mise en œuvre et de l'emploi des méthodes d'essai en laboratoire (34)(35). Les paragraphes qui suivent et l'appendice 2 décrivent les principaux éléments et procédures des essais sur EChR.

ÉLÉMENTS DES MÉTHODES D'ESSAI EChR

Conditions générales

25. Des cellules dérivées de cellules humaines pertinentes sont utilisées pour reconstituer un modèle tridimensionnel de tissu épithélial cornéen, qui doit être composé de cellules progressivement stratifiées mais non cornifiées. Le modèle d'EChR est préparé dans des plaques de culture avec une membrane synthétique poreuse au travers de laquelle les nutriments peuvent atteindre les cellules. Le modèle d'épithélium cornéen reconstitué comporte plusieurs couches viables de cellules épithéliales non kératinisées. Le modèle d'EChR présente une surface épithéliale en contact direct avec l'air, de façon à permettre une application locale directe des produits chimiques d'essai similaire à une exposition *in vivo* de l'épithélium cornéen aux produits chimiques. Le modèle d'EChR forme une barrière fonctionnelle suffisamment robuste pour résister à la pénétration rapide des substances cytotoxiques étalons telles que le Triton X-100 ou le dodécylsulfate de sodium (SDS). La fonction de barrière devra être démontrée et peut être évaluée en déterminant soit la durée d'exposition nécessaire pour réduire la viabilité tissulaire de 50 % (TE_{50}) après application de la substance étalon à une concentration fixe déterminée (100 µl de Triton X-100 à 0,3 % (v/v), par exemple), soit la concentration nécessaire pour réduire la viabilité tissulaire de 50 % (CI_{50}) après application de la substance étalon pendant une durée d'exposition fixée (30 minutes de traitement avec 50 µl de SDS, par exemple) (voir paragraphe 30). Le modèle d'EChR présente des propriétés de confinement suffisantes pour éviter que le produit chimique d'essai puisse contourner le tissu viable, ce qui nuirait à la qualité de la modélisation de l'exposition de la cornée. Les cellules d'origine humaine utilisées dans le modèle d'EChR sont exemptes de toute contamination bactérienne, virale, mycoplasmique ou mycosique. Le fournisseur vérifie la stérilité du modèle tissulaire et l'absence de contamination mycosique ou bactérienne.

Conditions fonctionnelles

Viabilité

26. La viabilité est mesurée au moyen du test MTT (16). Dans les cellules viables du modèle d'EChR, le colorant vital MTT est réduit en un précipité bleu de formazan, qui est ensuite extrait du tissu avec de l'isopropanol (ou unsolvant semblable). Le formazan extrait peut être quantifié soit en mesurant l'absorbance (densité optique, DO), soit suivant une procédure d'analyse par CLHP/CLUP-spectrophotométrie (36). La DO du solvant d'extraction seul doit être suffisamment faible, c'est-à-dire < 0,1. Les utilisateurs du modèle d'EChR s'assurent que chaque lot de tissu EChR remplit les critères définis pour le témoin négatif. Les plages d'acceptabilité pour la DO du témoin négatif pour les MRV sont précisées au tableau 2. Les utilisateurs de la procédure CLHP/CLUP-spectrophotométrie utilisent la plage de DO du témoin négatif fournie au tableau 2 comme critère d'acceptabilité pour le témoin négatif. Il doit être prouvé que les tissus traités avec le témoin négatif sont stables en culture (c'est-à-dire qu'ils présentent des mesures de viabilité

▼M8

comparables) tout au long de la période d'exposition. Le producteur du tissu suit une procédure semblable dans le cadre du contrôle qualité des lots de tissu, mais dans ce cas les critères d'acceptabilité applicables sont différents de ceux spécifiés au tableau 2. Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour les valeurs de DO du témoin négatif (dans les conditions de la méthode d'essai du contrôle qualité) est établie par le développeur/fournisseur du modèle d'EChR.

Tableau 2

Plages d'acceptabilité pour la DO du témoin négatif (pour les utilisateurs de l'essai)

Essai	Valeur limite inférieure d'acceptation	Valeur limite supérieure d'acceptation
TIO EpiOcular™ (OCL-200) – MRV1 (protocoles pour les liquides et les solides)	> 0,8 ([1])	< 2,5
TIO HCE SkinEthic™ (HCE/S) – MRV2 (protocoles pour les liquides et les solides)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Cette plage d'acceptabilité prend en compte la possibilité d'allonger la durée de transport/stockage (> 4 jours, par exemple), dont il a été démontré qu'elle n'a pas d'incidence sur le bon déroulement de la méthode d'essai (37).

Fonction de barrière

27. Le modèle d'EChR doit être suffisamment épais et résistant pour résister à la pénétration rapide de substances cytotoxiques étalons. Cette capacité est évaluée par la valeur TE_{50} (Triton X-100) ou par la CI_{50} (SDS), par exemple (tableau 3). La fonction de barrière de chaque lot de modèle d'EChR est démontrée par le développeur/fournisseur lors de la fourniture des tissus à l'utilisateur final (voir paragraphe 30).

Morphologie

28. L'examen histologique du modèle d'EChR doit mettre en évidence une structure semblable à celle de l'épithélium cornéen humain (comprenant au moins 3 couches de cellules épithéliales viables et une surface non kératinisée). Pour les MRV, une morphologie adéquate a été démontrée par le développeur/fournisseur et il n'est donc pas nécessaire de la démontrer à nouveau chaque fois qu'un utilisateur fait usage d'un lot.

Reproductibilité

29. La reproductibilité dans le temps des résultats obtenus à l'aide des témoins positifs et négatifs doit être démontrée.

Contrôle de qualité

30. Il est impératif que le développeur/fournisseur du modèle d'EChR garantisse et démontre que chaque lot utilisé répond à des critères de fabrication définis, dont les plus pertinents sont ceux relatifs à la viabilité (paragraphe 26) et à la fonction de barrière (paragraphe 27). Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour la fonction de barrière telle que mesurée avec le TE_{50} ou la CI_{50} (voir paragraphes 25 et 26) est établie par le développeur/fournisseur du modèle d'EChR. La plage d'acceptabilité pour les valeurs TE_{50} et CI_{50} retenues par le développeur/fournisseur des lots de tissu d'EChR (utilisés dans les MRV) lors du contrôle de qualité, est donnée au tableau 3. Le développeur/fournisseur des tissus d'EChR doit fournir les données démontrant le respect de tous les critères de fabrication aux utilisateurs de la méthode d'essai, afin qu'ils puissent présenter ces informations dans le rapport d'essai. Seuls les résultats obtenus avec des tissus remplissant tous les critères de fabrication définis peuvent être considérés comme des prédictions fiables pour les produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves selon le SGH de l'ONU/le règlement CLP.

▼M8

Tableau 3

Critères de contrôle de qualité des lots

Essai	Valeur limite inférieure d'acceptation	Valeur limite supérieure d'acceptation
TIO EpiOcular™ (OCL-200) - MRV1 (100 µl de Triton X-100 à 0,3 % (v/v))	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
TIO HCE SkinEthic™ (HCE/S) – MRV2 (traitement de 30 min avec 50 µl de SDS)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Application des produits chimiques d'essai et témoins

31. Il convient d'utiliser au minimum deux réplicats de tissus par produit chimique d'essai et par substance témoin dans chaque épreuve. Deux protocoles de traitement différents sont employés pour les produits chimiques d'essai liquides et pour les produits chimiques d'essai solides (34)(35). Dans les deux méthodes et les deux protocoles, avant d'être exposée à un produit chimique d'essai, la surface des modèles tissulaires est pré-traitée avec du tampon phosphate salin de Dulbecco sans calcium et sans magnésium (DPBS sans Ca^{2+}/Mg^{2+}), pour reproduire le plus fidèlement possible les conditions d'humidité de l'œil humain. Les tissus sont traités avec le(s) produit(s) chimique(s) testé(s) ou avec les substances témoin. Dans les deux protocoles des deux MRV, il convient d'appliquer une quantité suffisante de produit chimique d'essai ou de substance témoin pour recouvrir uniformément la surface épithéliale sans pour autant utiliser une dose infinie (voir paragraphes 32 et 33) (appendice 2).

32. Les produits chimiques d'essai pouvant être appliqués à la pipette à 37 °C ou à des températures plus basses (au besoin, avec une pipette à piston) sont considérés comme des liquides dans les MRV. Dans le cas contraire, ils sont considérés comme des solides (voir paragraphe 33). Dans les MRV, le produit chimique d'essai liquide est appliqué uniformément sur la surface de tissu (soit une application d'au moins 60 µl/cm^2) (voir appendice 2 (33)(34)). Il convient d'éviter autant que possible les effets de capillarité (effets de tension de surface) pouvant être observés en raison des faibles volumes appliqués sur les inserts (surface de tissu), ce afin de garantir un bon dosage sur le tissu. Les tissus traités avec les produits chimiques d'essai liquides sont incubés pendant 30 minutes dans les conditions de culture normalisées (37±2 °C, sous CO_2 5±1 %, HR ≥ 95 %). À la fin de la période d'exposition, les produits chimiques d'essai et les substances témoin sont soigneusement éliminés de la surface de tissu par un rinçage abondant au DPBS sans Ca^{2+}/Mg^{2+} à température ambiante. Cette étape de rinçage est suivie par une immersion post-traitement dans un milieu de culture frais à température ambiante (afin d'éliminer tout produit chimique d'essai absorbé par le tissu) pendant une durée prédéfinie qui varie en fonction de la MRV utilisée. Pour la MRV1 seulement, une incubation post-traitement est réalisée dans un milieu de culture frais dans les conditions de culture normalisées, avant d'effectuer le test MTT (voir appendice 2 (34)(35)).

33. Les produits chimiques d'essai ne pouvant pas être appliqués à la pipette à 37 °C ou à des températures plus basses sont considérés comme des solides dans les MRV. La quantité appliquée doit être suffisante pour recouvrir complètement la surface de tissu, à savoir une application d'au moins 60 mg/cm^2 (appendice 2). Chaque fois que possible, il convient de tester les solides sous la forme d'une poudre fine. Les tissus traités avec les produits chimiques d'essai solides sont incubés pendant une durée prédéfinie (en fonction de la VRM utilisée) dans les conditions de culture normalisées (voir appendice 2 (34)(35)). À la fin de la période d'exposition, les produits chimiques d'essai et les substances témoin sont soigneusement éliminés de la

▼M8

surface de tissu par un rinçage abondant au DPBS sans Ca^{2+}/Mg^{2+} à température ambiante. Cette étape de rinçage est suivie par une immersion post-traitement pendant une durée prédéfinie (qui varie en fonction de la VRM utilisée) dans un milieu de culture frais à température ambiante (afin d'éliminer tout produit chimique d'essai absorbé par le tissu) puis par une incubation post-traitement dans un milieu frais dans les conditions de culture normalisées, avant d'effectuer le test MTT (voir appendice 2, (34)(35)).

34. Des témoins négatifs et positifs sont utilisés simultanément dans chaque épreuve, afin de démontrer que la viabilité (dans le cas du témoin négatif) et la sensibilité (dans le cas du témoin positif) des tissus se situent dans une fourchette historique définie de valeurs acceptables. Le témoin négatif permet aussi de fixer la valeur de départ (viabilité à 100 %) à partir de laquelle est calculée la viabilité relative (en pourcentage) des tissus traités avec les produits chimiques d'essai ($\%viabilité_{test}$). La substance recommandée pour le témoin positif dans les MRV est l'acétate de méthyle pur (N°CAS 79-20-9; Sigma-Aldrich, Cat# 45997; liquide). Les substances recommandées pour le témoin négatif dans la MRV1 et la MRV2 sont l'eau (H_2O) extra-pure et le DPBS sans Ca^{2+}/Mg^{2+}, respectivement. Ces substances sont celles employées comme témoins dans les études de pré-validation et de validation des MRV, et celles pour lesquelles il existe le plus de données historiques. L'utilisation d'autres substances adéquates pour les témoins positifs et négatifs doit être dûment justifiée scientifiquement. Les témoins négatif et positif sont testés suivant les mêmes protocoles que ceux utilisés pour les produits chimiques d'essai dans l'épreuve (liquides et solides). Cette application est suivie d'une exposition au traitement, d'un rinçage, d'une immersion post-traitement et d'une incubation post-traitement le cas échéant, tel que décrit pour les témoins utilisés simultanément avec les produits chimiques liquides (voir paragraphe 32) ou pour les témoins utilisés simultanément avec les produits chimiques solides (voir paragraphe 33), avant d'effectuer le test MTT (voir paragraphe 35) (34)(35). Un seul témoin positif et un seul témoin négatif par épreuve suffisent pour tous les produits chimiques d'essai présentant le même état physique (liquide ou solide).

Mesure de la viabilité tissulaire

35. Le test MTT est une méthode quantitative normalisée (16) qu'il convient d'utiliser pour quantifier la viabilité des tissus dans la présente méthode d'essai. Elle est compatible avec une utilisation sur un modèle tissulaire tridimensionnel. Le test MTT est réalisé immédiatement après la période d'incubation post-traitement. Selon les MRV, l'échantillon de modèle d'EChR est immergé dans 0,3 ml de solution MTT à 1 mg/ml pendant 180±15 minutes dans les conditions de culture normalisées. Dans les cellules viables du modèle d'EChR, le colorant vital MTT est réduit en un précipité bleu de formazan. Le précipité bleu de formazan est ensuite extrait à l'aide d'un volume adéquat d'isopropanol (ou d'un solvant similaire)(34)(35). Pour les tissus exposés à des produits chimiques d'essai liquides, l'extraction est faite à partir des couches supérieure et inférieure des tissus, tandis que, pour les tissus exposés à des produits chimiques d'essai solides ou à des liquides colorés, l'extraction est faite à partir de la seule couche inférieure du tissu (afin de réduire au minimum tout risque de contamination de la solution d'isopropanol d'extraction avec un résidu de produit chimique d'essai présent dans les tissus). Pour les tissus exposés à des produits chimiques d'essai difficiles à rincer, l'extraction peut aussi être faite à partir de la seule couche inférieure du tissu. Les substances témoin positives et négatives testées en parallèle sont traitées de la même manière que les produits chimiques d'essai. Le formazan extrait est quantifié soit par mesure de l'absorbance (DO) à 570 nm et avec un filtre passe-bande d'une largeur maximale de ±30 nm, soit par CLHP/CLUP-spectrophotométrie (voir paragraphe 42) (11)(36).

▼**M8**

36. Les propriétés optiques du produit chimique d'essai ou son action chimique sur le MTT sont susceptibles d'interférer avec le test MTT et de conduire à des estimations erronées de la viabilité des tissus. Les produits chimiques d'essai sont susceptibles d'interférer avec le test MTT par réduction directe du MTT en formazan bleu et/ou par interférence de couleurs si le produit chimique d'essai absorbe, naturellement ou sous l'effet des procédures du traitement, dans la même plage de DO que le formazan (c'est-à-dire autour de 570 nm). Des vérifications préliminaires sont effectuées avant le test, pour permettre de repérer les éventuels produits chimiques réducteurs directs du MTT et/ou provoquant une interférence de couleurs, et des témoins supplémentaires sont préparés pour détecter les interférences pouvant être causées par ces produits chimiques et corriger l'essai en conséquence (voir paragraphes 37-41). Cela est particulièrement important lorsque le produit chimique d'essai n'a pas été totalement éliminé du modèle d'EChR lors du rinçage, ou lorsqu'il pénètre dans le modèle d'épithélium cornéen et est donc présent dans le tissu d'EChR au moment où le test MTT est mené. Pour les produits chimiques d'essai qui absorbent la lumière dans la même plage que le formazan (naturellement ou après traitement), et qui sont incompatibles avec la mesure de l'absorbance (DO) du formazan à cause d'une interférence excessive (absorption élevée à 570±30 nm), une procédure d'analyse par CLHP/CLUP-spectrophotométrie peut être effectuée pour mesurer la présence de formazan (voir paragraphes 41 et 42) (11)(36). On trouvera dans les modes opératoires normalisés des MRV (34)(35) une description détaillée de la manière de détecter la réduction directe du MTT ou les interférences dues aux agents colorants et corriger l'essai en conséquence. Un organigramme présentant les étapes pour identifier et prendre en compte les produits chimiques réducteurs directs du MTT et/ou qui provoquent une interférence de couleurs dans les MRV1 et MRV2 est par ailleurs fourni dans les appendices 3 et 4, respectivement.

37. Pour repérer les interférences potentielles par des produits chimiques d'essai absorbant la lumière dans la même plage que le formazan (naturellement ou après traitement), et pour déterminer si des témoins supplémentaires sont nécessaires, le produit chimique d'essai est mélangé à de l'eau et/ou de l'isopropanol et incubé pendant une durée appropriée à température ambiante (voir appendice 2, (34)(35)). Si le produit chimique d'essai dans l'eau et/ou dans l'isopropanol absorbe assez la lumière à une longueur d'onde de 570±20 nm pour la MRV1 (voir appendice 3), ou si l'on obtient une solution colorée en mélangeant le produit chimique d'essai avec de l'eau pour la MRV2 (voir appendice 4), alors on considère que le produit chimique d'essai interfère avec la mesure de l'absorbance (DO) du formazan et des témoins colorés doivent être préparés, ou bien une procédure d'analyse par CLHP/CLUP-spectrophotométrie est employée et aucun témoin supplémentaire n'est nécessaire (voir paragraphes 41 et 42 et appendices 3 et 4)(34)(35). Lorsque les mesures d'absorbance (DO) sont effectuées, chaque produit chimique d'essai causant une interférence est appliqué sur au moins deux réplicats de tissus viables, et les deux réplicats sont soumis à la procédure d'essai complète, à la seule différence qu'ils sont incubés dans le milieu plutôt que dans la solution MTT lors de l'étape de l'incubation avec MTT, afin de générer un témoin de couleur non spécifique dans les tissus vivants ($CNS_{vivants}$) (34)(35). Le témoin $CNS_{vivants}$ est testé en parallèle de l'essai avec le produit chimique d'essai coloré et, dans le cas d'un essai multiple, un témoin $CNS_{vivants}$ indépendant est effectué pour chaque essai (dans chaque épreuve) pour tenir compte de la variabilité biologique inhérente aux tissus vivants. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit: le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au produit chimique causant une interférence et incubés avec la solution MTT ($\%viabilité_{test}$) moins le pourcentage de couleur non spécifique obtenu pour les tissus vivants exposés au produit chimique causant une interférence et incubés dans du milieu sans MTT en parallèle de l'essai à corriger ($\%CNS_{vivants}$), soit Viabilité tissulaire réelle = [$\%viabilité_{test}$] − [$\%CNS_{vivants}$].

38. Afin d'identifier les agents réducteurs directs du MTT, il convient d'ajouter chaque produit chimique d'essai à un milieu MTT fraîchement préparé. Une quantité adéquate de produit chimique d'essai est ajoutée à une solution MTT et le mélange est incubé pendant environ 3 heures dans les conditions de culture normalisées (voir appendices 3et 4)(34)(35). Si le mélange de

▼**M8**

MTT et de produit chimique d'essai (ou la suspension testée pour les produits chimiques d'essai insolubles) devient bleu/violet, on considère que le produit chimique d'essai est un réducteur direct du MTT et il convient alors de procéder à des vérifications fonctionnelles supplémentaires sur les modèles de tissus d'EChR non viables, indépendamment du choix de mesurer l'absorbance (OD) ou de procéder par analyse par CLHP/CLUP-spectrophotométrie. Cette vérification s'effectue sur des tissus tués qui ne présentent qu'une activité métabolique résiduelle, mais absorbent et retiennent le produit chimique d'essai dans des proportions similaires aux tissus viables. Dans la MRV1, les tissus tués sont préparés par exposition à des températures basses («tués par congélation»). Dans la MRV2, les tissus tués sont préparés par une incubation longue (au moins 24±1h, par exemple) dans l'eau suivie d'un stockage à basse température («tués dans l'eau»). Chaque produit chimique réducteur du MTT est appliqué sur au moins deux réplicats de tissus tués qui sont soumis à la procédure d'essai complète pour générer un témoin de réduction non spécifique du MTT (NSMTT) (34)(35). Un seul témoin NSMTT par produit chimique d'essai suffit, indépendamment du nombre d'épreuves indépendantes menées. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit: le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au réducteur du MTT (%viabilité$_{test}$) moins le pourcentage de réduction non spécifique du MTT obtenu pour les tissus tués exposés au même réducteur du MTT et calculé en proportion du témoin négatif testé en parallèle de l'essai à corriger (%NSMTT), soit Viabilité tissulaire réelle = [%viabilité$_{test}$] - [%NSMTT].

39. Dans le cas des produits chimiques identifiés comme causant à la fois une interférence de couleurs (voir paragraphe 37) et une réduction directe du MTT (voir paragraphe 38), une troisième série de témoins est nécessaire lors de la mesure de l'absorbance (DO), en plus des témoins NSMTT et $CNS_{vivants}$ décrits aux paragraphes précédents. En général, ce cas se présente pour les produits chimiques d'essai foncés qui absorbent la lumière à une longueur d'onde de 570±30 nm (bleus, violets, noirs, par exemple), car leur couleur intrinsèque empêche l'évaluation de leur potentiel de réduction directe du MTT décrite au paragraphe 38. Cela rend la réalisation des témoins NSMTT et $CNS_{vivants}$ obligatoires par principe. Les produits chimiques d'essai nécessitant la réalisation des deux témoins NSMTT et $CNS_{vivants}$ sont susceptibles d'être absorbés et retenus à la fois par les tissus vivants et par les tissus tués. Par conséquent et dans ce cas, l'utilisation du témoin NSMTT peut permettre de corriger l'essai non seulement en fonction du potentiel de réduction directe du MTT du produit chimique d'essai, mais aussi de l'interférence de couleurs due à l'absorption et la rétention du produit chimique d'essai par les tissus tués. Cela signifie qu'une double correction pour tenir compte de l'interférence de couleurs peut devoir être effectuée, étant donné quele témoin $CNS_{vivants}$ permet déjà de tenir compte de l'interférence de couleurs due à l'absorption et à la rétention du produit chimique d'essai par les tissus vivants. Afin d'éviter cette double correction pour tenir compte de l'interférence de couleurs, un troisième témoin pour la couleur non spécifique dans les tissus tués ($CNS_{tués}$) doit être préparé (voir appendice 3 et 4)(34)(35). Dans ce témoin supplémentaire, le produit chimique d'essai est appliqué sur au moins deux réplicats de tissus tués qui sont soumis à la procédure d'essai complète mais qui sont incubés dans le milieu plutôt que dans la solution MTT lors de l'étape d'incubation avec MTT. Un seul témoin $CNS_{tués}$ par produit chimique d'essai suffit, indépendamment du nombre d'épreuves, mais il doit être mené en parallèle du témoin NSMTT et sur le même lot de tissus. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit: le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au produit chimique d'essai (%viabilité$_{test}$) moins %NSMTT moins %$CNS_{vivants}$ plus le pourcentage de couleur non spécifique obtenu pour les tissus tués exposés au produit chimique d'essai causant une interférence et incubés dans du milieu sans MTT, calculé en proportion du témoin négatif mené en parallèle de l'essai à corriger (%$CNS_{tués}$), soit Viabilité tissulaire réelle = [%viabilité$_{test}$] - [%NSMTT] - [%$CNS_{vivants}$] + [%$CNS_{tués}$].

▼**M8**

40. Il importe de noter qu'une réduction non spécifique du MTT et des interférences de couleurs non spécifiques peuvent porter l'absorbance (DO) de l'extrait tissulaire au-dessus de la plage de linéarité du spectrophotomètre (lors des mesures de densité optique), et qu'une réduction non spécifique du MTT peut aussi élargir la surface de pic de formazan de l'extrait tissulaire au-delà de la plage de linéarité du spectrophotomètre (lors des mesures par CLHP/CLUP-spectrophotométrie). Il est donc important que chaque laboratoire détermine la plage de linéarité de son spectrophotomètre (pour la DO/surface de pic), par exemple à l'aide de formazan (CAS # 57360-69-7), disponible dans le commerce auprès de l'entreprise Sigma-Aldrich (Cat# M2003), avant de tester les produits chimiques à des fins réglementaires.

41. La mesure standard de l'absorbance (DO) avec un spectrophotomètre est indiquée pour l'évaluation des produits chimiques d'essai réducteurs directs du MTT et causant une interférence de couleurs, lorsque l'interférence observée n'est pas trop forte par rapport à la mesure (c'est-à-dire lorsque les DO des extraits tissulaires obtenues pour le produit chimique d'essai sans correction pour tenir compte de la réduction directe du MTT et/ou de l'interférence de couleurs sont comprises dans la plage de linéarité du spectrophotomètre). Cependant, les résultats correspondant aux produits chimiques d'essai pour lesquels les valeurs %NSMTT et/ou $\%CNS_{vivants}$ sont $\geq$ 60 % (MRV1, et MRV2 pour le protocole des liquides) ou 50 % (MRV2 pour le protocole des solides) du témoin négatif doivent être utilisés avec précaution, car il s'agit des seuils retenus dans les MRV pour faire la distinction entre les produits chimiques relevant d'une catégorie et ceux «sans catégorie» (voir paragraphe 44). A contrario, l'absorbance (DO) ne peut pas être mesurée lorsque l'interférence avec la mesure du formazan est trop forte (c'est-à-dire lorsque les DO non corrigées des extraits tissulaires testés sont situées en dehors de la plage de linéarité du spectrophotomètre). Les produits chimiques d'essai colorés ou ceux devenant colorés au contact de l'eau ou de l'isopropanol qui interfèrent trop fortement avec l'absorbance (DO) mesurée pour le formazan peuvent être évalués par une procédure de CLHP/CLUP-spectrophotométrie (voir appendices 3 et 4), car le système CLHP/CLUP permet de séparer le formazan du produit chimique avant la quantification (36). Pour cette raison, les témoins $CNS_{vivants}$ et $CNS_{tués}$ ne sont pas nécessaires pour la procédure CLHP/CLUP-spectrophotométrie, quel que soit le produit chimique soumis à l'essai. Les témoins NSMTT sont néanmoins nécessaires si l'on s'attend à ce que le produit chimique d'essai soit un réducteur direct du MTT (en suivant la procédure décrite au paragraphe 38). Les témoins NSMTT sont aussi nécessaires pour les produits chimiques d'essai colorés (naturellement ou au contact de l'eau) dont la couleur empêche l'évaluation de leur potentiel de réduction directe du MTT, comme décrit au paragraphe 38. Lorsqu'une procédure par CLHP/CLUP-spectrophotométrie est employée pour quantifier le formazan, la viabilité tissulaire est calculée en pourcentage par comparaison de la surface de pic de formazan obtenue avec des tissus vivants exposés au produit chimique d'essai avec la surface de pic de formazan obtenue avec le témoin négatif parallèle. Pour les produits chimiques d'essai réducteurs directs du MTT, la viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit: $\%viabilité_{test}$ moins %NSMTT, comme décrit à la dernière phrase du paragraphe 38. Pour finir, il convient de noter que les réducteurs directs du MTT ou les réducteurs directs du MTT causant aussi une interférence de couleurs, qui sont retenus dans les tissus après le traitement et dont la capacité de réduction du MTT est telle qu'elle conduit à des DO (pour la mesure de DO) ou à des surfaces de pic (pour la procédure CLHP/CLUP-spectrophotométrie) des extraits tissulaires testés situées en dehors de la plage de linéarité du spectrophotomètre, ne peuvent pas être évalués avec les méthodes d'essai sur EChR; ce cas ne se présente a priori que très rarement.

42. La procédure par CLHP/CLUP-spectrophotométrie est utilisable pour mesurer le formazan pour tous les types de produits chimiques (colorés ou non, réducteurs ou non réducteurs du MTT) (11)(36). Étant donné la diversité des équipements de CLHP/CLUP-spectrophotométrie, tous les utilisateurs ne pourront pas reproduire des conditions d'équipement identiques.

▼M8

Pour cette raison, preuve doit être faite de l'efficacité de l'équipement de CLHP/CLUP-spectrophotométrie avant que celui-ci ne soit utilisé pour quantifier le formazan des extraits tissulaires, en remplissant les critères d'acceptabilité pour un ensemble de paramètres normalisés de qualification inspirés des paramètres décrits dans les recommandations à l'industrie de la *Food and Drug Administration* des États-Unis sur la validation des méthodes de bio-analyse (36)(38). Ces paramètres fondamentaux et leurs critères d'acceptation sont fournis à l'appendice 5. Une fois que les critères d'acceptabilité définis à l'appendice 5 ont été remplis, l'équipement de CLHP/CLUP-spectrophotométrie est considéré comme ayant fait la preuve de son efficacité et prêt pour les mesures du formazan dans les conditions expérimentales décrites dans la présente méthode d'essai.

Critères d'acceptation

43. Pour chaque épreuve recourant à des lots de tissus d'EChR remplissant les critères du contrôle de qualité (voir paragraphe 30), les tissus traités avec le témoin négatif présentent une DO reflétant la qualité des tissus qui ont été transportés, réceptionnés et soumis à toutes les étapes du protocole et se situant dans les limites historiques décrites au tableau 2 (voir paragraphe 26). De même, les tissus traités avec le témoin positif, c'est-à-dire l'acétate de méthyle, présentent une viabilité cellulaire < 50 % par comparaison avec le témoin négatif pour la MRV1 soit avec le protocole des liquides, soit avec le protocole des solides, et une viabilité cellulaire ≤ 30 % (protocole pour des liquides) ou ≤ 20 % (protocole des solides) pour la MRV2. Ces valeurs reflètent la capacité des tissus à réagir à un produit chimique irritant dans les conditions de la méthode d'essai (34)(35). La variabilité entre les réplicats de tissus pour les produits chimiques d'essai et pour les substances témoin doit se situer dans la fourchette acceptable (différence de viabilité entre deux réplicats de tissus inférieure à 20 %, ou écart-type entre trois réplicats de tissus ne dépassant pas 18 %). Si l'un des témoins (négatif ou positif) réalisés dans une épreuve se situe en dehors de la fourchette acceptable, l'épreuve est considérée comme «non valable» et doit être refaite. Si la variabilité entre les réplicats de tissus pour un produit chimique d'essai se situe en dehors de la fourchette acceptable, l'essai est considéré comme «non valable» est le produit chimique doit être à nouveau soumis à l'essai.

Interprétation des résultats et modèle prédictif

44. Les valeurs de DO/surfaces de pic obtenues avec les réplicats d'extraits de tissus pour chaque produit chimique d'essai sont utilisées pour calculer le pourcentage moyen de viabilité tissulaire (moyenne entre les réplicats de tissus) par rapport à la viabilité du témoin négatif (fixée à 100 %). La valeur seuil du pourcentage de viabilité tissulaire, qui permet de distinguer les produits chimiques relevant d'une catégorie pour irritation oculaire ou lésions oculaires graves de ceux «sans catégorie» selon le SGH de l'ONU et le règlement CLP, est donnée au tableau 4. Les résultats sont donc interprétés comme suit:

— Le produit chimique d'essai est considéré comme ne relevant d'aucune catégorie selon le SGH de l'ONU et le règlement CLP («sans catégorie») si le pourcentage moyen de viabilité cellulaire après l'exposition et l'incubation post-traitement est supérieur (>) au seuil défini du pourcentage de viabilité tissulaire, conformément au tableau 4. Dans ce cas, aucun essai supplémentaire avec d'autres méthodes d'essai n'est nécessaire.

▼M8

— Aucune prédiction n'est possible si le pourcentage moyen de viabilité cellulaire après l'exposition et l'incubation post-traitement est inférieur ou égal (≤) au seuil défini du pourcentage de viabilité tissulaire, conformément au tableau 4. Dans ce cas, il est nécessaire de mener des essais supplémentaires avec d'autres méthodes d'essai, car les méthodes d'essai sur EChR produisent un nombre non négligeable de faux positifs (voir paragraphes 14 et 15) et ne permettent pas de distinguer entre les catégories 1 et 2 du SGH de l'ONU et le règlement CLP (voir paragraphe 17).

Tableau 4

Modèles de prédiction d'après la classification du SGH de l'ONU et du règlement CLP

MRV	Sans Categorie	Aucune prédiction possible
MRV1 - TIO EpiOcular™ (pour les deux protocoles)	Viabilité tissulaire moyenne > 60 %	Viabilité tissulaire moyenne ≤ 60 %
MRV2 - TIO HCE SkinEthic™ (pour le protocole des liquides))	Viabilité tissulaire moyenne > 60 %	Viabilité tissulaire moyenne ≤ 60 %
MRV2 - TIO HCE SkinEthic™ (pour le protocole des solides)	Viabilité tissulaire moyenne > 60 %	Viabilité tissulaire moyenne ≤ 60 %

45. Un seul essai réalisé à l'aide d'au moins deux réplicats de tissus devrait suffire pour tester un produit chimique dont les résultats sont sans équivoque. En revanche, dans le cas de résultats ambigus, tels que des mesures non concordantes pour les différents réplicats et/ou un pourcentage moyen de viabilité égal à 60±5 % (MRV1, et MRV2 pour le protocole des liquides) ou 50±5 % (MRV2 pour le protocole des solides), une seconde répétition est envisagée, voire une troisième en cas de résultats discordants entre les deux premières.

46. Il est envisageable d'utiliser des valeurs seuil de pourcentage de viabilité tissulaire différentes pour distinguer les produits chimiques relevant ou ne relevant pas d'une catégorie dans certains cas particuliers de mélanges, si nécessaire et justifiable, pour améliorer la performance générale de la méthode d'essai concernant ces types de mélanges (voir paragraphe 14). Les produits chimiques étalons peuvent s'avérer utiles pour évaluer le potentiel de lésions oculaires graves/d'irritation oculaire de produits chimiques ou de mélanges inconnus relevant de classes spécifiques de substances chimiques ou de produits, ou encore pour évaluer le potentiel relatif de toxicité oculaire d'un produit chimique classé dans une gamme spécifique de réactions d'irritation.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Données

47. Les données de chaque réplicat de tissus dans une épreuve (valeurs DO/surfaces de pic de formazan, données calculées du pourcentage de viabilité tissulaire pour le produit chimique d'essai et pour le témoin, prédiction conclusive de la méthode d'essai sur EChR, par exemple) sont présentées dans un tableau pour chacun des produits chimiques d'essai, y compris les données des répétitions, le cas échéant. De plus, le pourcentage moyen de viabilité tissulaire et la différence (si n=2 réplicats de tissus) ou l'écart-type (si n ≥ 3 réplicats de tissus) pour chacun des produits chimiques d'essai et pour les témoins sont présentés. Toute interférence avec le test MTT observée pour un produit chimique d'essai à cause de la réduction directe du MTT et/ou d'une interférence de couleurs est indiquée pour chacun des produits chimiques soumis à essai.

Rapport d'essai

48. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

▼**M8**

Produit chimique d'essai

Substance mono-constituant

— identification chimique, telle que désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants;

— état physique, volatilité, pH, LogP, poids moléculaire, classe chimique et autres propriétés physico-chimiques pertinentes pour la conduite de l'essai, selon les données disponibles;

— pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.*;*

— traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);

— conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Substance multi-constituants, UVCB ou mélange

— caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;

— état physique et autres propriétés physico-chimiques pertinentes pour la conduite de l'essai, selon les données disponibles;

— pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;

— traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);

— conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Témoins positifs et négatifs

— identification chimique telle que désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants;

— état physique, volatilité, pH, LogP, poids moléculaire, classe chimique et autres propriétés physico-chimiques pertinentes pour la conduite de l'essai, selon les données disponibles;

— pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;

— traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);

— conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;

— justification de l'utilisation d'un témoin négatif autre que l'eau (H_2O) extra-pure ou que le DPBS sans $Ca^{2+/}Mg^{2+}$, le cas échéant;

— justification de l'utilisation d'un témoin positif autre que l'acétate de méthyle pur, le cas échéant;

— référence aux données historiques des témoins positifs et négatifs démontrant la conformité aux critères d'acceptabilité.

Renseignements relatifs au donneur d'ordre et à l'installation d'essai

— Nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude.

— *Modèle d'EChR et protocole employés (explication des raisons du choix, le cas échéant)*

▼**M8**

Conditions de la méthode d'essai

— modèle tissulaire d'EChR employé, y compris le numéro de lot;

— longueur d'onde et largeur de bande (le cas échéant) employées pour quantifier le bleu de formazan, et plage de linéarité de l'appareil de mesure (par exemple spectrophotomètre);

— desscription de la méthode de quantification du bleu de formazan employée;

— description du système CLHP/CLUP-spectrophotomètre utilisé, le cas échéant;

— informations complètes sur le modèle spécifique d'EChR utilisé, notamment sur ses performances, à savoir (liste non limitative):

i) viabilité lors du contrôle qualité (fournisseur);

ii) viabilité dans les conditions de la méthode d'essai (utilisateur);

iii) fonction de barrière lors du contrôle qualité;

iv) morphologie, selon les informations disponibles;

v) reproductibilité et valeur prédictive;

vi) autre contrôle de qualité (CQ) des modèles tissulaires d'EChR, selon les informations disponibles;

— références aux données historiques du modèle tissulaire d'EChR, à savoir (liste non limitative): acceptabilité des données de CQ par rapport aux données historiques des lots;

— déclaration de démonstration de la compétence du laboratoire dans l'application de la méthode d'essai (en testant les substances d'épreuve) avant son application en routine.

Critères d'acceptabilité pour les épreuves et pour l'essai

— moyennes et fourchettes de valeur acceptables pour les témoins positifs et négatifs, sur la base des données historiques;

— variabilité acceptable entre les réplicats de tissus pour les témoins positifs et négatifs;

— variabilité acceptable entre les réplicats de tissus pour les produits chimiques d'essai;

Mode opératoire

— détails du protocole utilisé;

— doses employées pour le produit chimique d'essai et les substances témoin;

— durée et température des périodes d'exposition, d'immersion post-traitement et d'incubation post-traitement (le cas échéant);

— description de toute modification éventuelle du protocole;

▼M8

— indication des témoins utilisés pour les agents réducteurs directs du MTT et/ou pour les produits chimiques d'essai colorés, le cas échéant;

— nombre de réplicats de tissus utilisés par produit chimique d'essai et substance témoin (témoin positif, témoin négatif, NSMTT, $CNS_{vivants}$ et $CNS_{tués}$, le cas échéant);

Résultats

— tableau de données pour chaque produit chimique d'essai et substance témoin pour chaque épreuve (et ses répétitions, le cas échéant) et pour les mesures de chaque réplicat, y compris la valeur de DO ou la surface de pic du formazan, le pourcentage de viabilité tissulaire, le pourcentage moyen de viabilité tissulaire, la différence ou l'écart-type entre les réplicats de tissus, et la prédiction finale;

— le cas échéant, résultats des témoins réalisés pour les réducteurs directs du MTT et/ou les produits chimiques colorés, y compris la valeur de DO ou la surface de pic du formazan, %NSMTT, $\%CNS_{vivants}$, $\%CNS_{tués}$, différence ou écart-type entre les réplicats de tissus, pourcentage final corrigé de viabilité tissulaire, et prédiction finale;

— résultats obtenus pour le(s) produit(s) chimique(s) testé(s) et les substances témoin comparés aux critères d'acceptation pour les épreuves et pour l'essai;

— description des autres effets observés, par exemple, coloration des tissus par un produit chimique d'essai coloré;

Discussion des résultats

Conclusion

BIBLIOGRAPHIE

(1) Nations Unies (ONU) (2015). Système Général Harmonisé de Classification et d'Etiquetage des Produits Chimiques (SGH). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixième édition révisée, New York et Genève: Nations Unies. Disponible à l'adresse: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Chapitre B.5 de la présente annexe, Effet irritant/corrosif aigu sur les yeux.

(3) Chapitre B.47 de la présente annexe, Méthode d'essai d'opacité et de perméabilité de la cornée bovine pour l'identification des produits chimiques i) provoquant des lésions oculaires graves ou ii) ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire.

(4) Chapitre B.48 de la présente annexe, méthode d'essai sur œil de poulet isolé pour l'identification des produits chimiques i) provoquant des lésions oculaires graves et ii) ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire.

(5) Chapitre B.61 de la présente annexe, Méthode d'essai de diffusion de fluorescéine pour identifier les substances corrosives et fortement irritantes pour l'œil.

▼**M8**

(6) Chapitre B.68 de la présente annexe, Méthode d'essai d'exposition de courte durée in vitro pour l'identification des produits chimiques i) provoquant des lésions oculaires graves ou ii) ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire.

(7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010,261-266.

(8) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Available at: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280.

(9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Available at: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702.

(10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.

(11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.

(12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Available at: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704.

(13) EC EURL ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Manuscript in Preparation).

(14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. Journal of *Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.

(15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

▼**M8**

(16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(17) OCDE (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(18) OCDE (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.

(20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, pp. 147-159.

(21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.

(22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476-1488.

(23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.

(24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

(25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.

(26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.

▼**M8**

(27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N.and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.

(28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.

(29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922–936.

(30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.

(31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115–130.

(32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610–2625.

(33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41–54.

(34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Available at: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

(35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Available at: https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index.

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.

(37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.

(38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Available at: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf.

(39) OCDE (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

▼**M8**

Appendice 1

DÉFINITIONS

Précision: degré de conformité entre les résultats d'une méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa pertinence. Ce terme et le terme «concordance» sont souvent utilisés indifféremment pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (18).

Produit chimique étalon: produit chimique utilisé comme référence dans une comparaison avec un produit chimique d'essai. Un produit chimique étalon doit posséder les propriétés suivantes: (i) provenir d'une ou de plusieurs sources régulières et fiables permettant de l'identifier et de le caractériser; (ii) présenter une similitude structurale et/ou fonctionnelle avec la classe des produits chimiques d'essai; (iii) posséder des caractéristiques physiques et chimiques connues; (iv) être accompagné de données confirmant ses effets connus; et (v) avoir une puissance connue dans l'intervalle de la réponse désirée.

Approche «bottom-up»: approche en plusieurs étapes appliquée à un produit chimique présumé ne pas nécessiter de classification ou étiquetage pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, et dont la première étape consiste à distinguer les produits chimiques ne relevant d'aucune classification ni étiquetage (résultat négatif) des autres produits chimiques (résultat positif).

Produit chimique: substance ou mélange.

Concordance: Voir «Précision».

Cornée: Partie transparente située à l'avant du globe oculaire, recouvrant l'iris et la pupille et laissant pénétrer la lumière vers l'intérieur de l'œil.

CV: Coefficient de variation.

Dev: Deviation.

TIO: Test d'irritation oculaire.

EURL ECVAM: Laboratoire de référence de l'Union Européenne pour la validation de méthodes alternatives.

Irritation oculaire: modification de l'œil provoquée par l'application d'un produit chimique d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui est totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application. Interchangeable avec «Effets réversibles sur l'œil» et avec «Catégorie 2 du SGH de l'ONU/du règlement CLP».

TE_{50}: temps d'exposition nécessaire pour réduire la viabilité cellulaire de 50 % après application d'un produit chimique étalon à une concentration fixe spécifiée.

Taux de faux négatifs: proportion de produits chimiques positifs faussement identifiés comme négatifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Taux de faux positifs: proportion de produits chimiques négatifs faussement identifiés comme positifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Danger: propriété inhérente d'un agent ou d'une situation susceptible de provoquer des effets néfastes lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-)population est exposé(e) à cet agent.

HCE: épithélium cornéen humain du SkinEthic™.

▼**M8**

CLHP: chromatographie en phase liquide à haute performance.

CI_{50}: concentration nécessaire pour réduire la viabilité cellulaire de 50 % après application d'un produit chimique étalon pendant un temps d'exposition fixe (traitement de 30 minutes au SDS, par exemple.

Dose infinie: quantité de produit chimique d'essai appliquée sur le modèle tissulaire d'EChR qui dépasse la quantité requise pour recouvrir entièrement et uniformément la surface épithéliale.

Effets irréversibles sur l'œil: voir «lésions oculaires graves».

VLIQ: valeur limite inférieure de quantification.

LogP: logarithme du coefficient de partage octanol/eau

Mélange: mélange ou solution composé de deux substances ou plus.

Substance mono-constituant: substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un constituant principal est présent à une concentration d'au moins 80 % (m/m).

Substance multi-constituants: substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant principal est présent à une concentration comprise entre 10 % et 80 % (m/m). Une substance multi-constituants résulte d'un processus de fabrication. La différence entre un mélange et une substance multi-constituants est que le mélange est obtenu en associant deux substances ou plus sans réaction chimique. Une substance multi-constituants résulte d'une réaction chimique.

MTT: bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium; bleu de thiazolyl; bromure de tétrazolium.

Témoin négatif: échantillon contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec une substance connue pour ne pas induire de réponse positive du système d'essai. Cet échantillon subit les mêmes procédures que les échantillons traités avec le produit chimique d'essai et les autres échantillons témoins et sert à déterminer la viabilité tissulaire de 100 %.

Non classé: produit chimique ne relevant d'aucune classification pour l'irritation oculaire (catégorie 2 0du SGH de l'ONU/du règlement CLP, catégorie 2A ou 2B du SGH de l'ONU) ou pour des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP). Ce terme est interchangeable avec «Ssans catégorie».

$CNS_{tués:}$: couleur non spécifique dans les tissus tués.

$CNS_{vivants}$: couleur non spécifique dans les tissus vivants.

NSMTT: Réduction non spécifique du MTT.

DO: densité optique.

Normes de performance: normes, fondées sur une méthode d'essai validée et considérée comme scientifiquement valide, permettant d'évaluer la comparabilité d'une méthode d'essai proposée structurellement et fonctionnellement similaire. Elles comprennent: (i) les éléments essentiels de la méthode d'essai, (ii) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi ceux utilisés pour démontrer les performances acceptables de la méthode d'essai validée, et (iii) les niveaux de précision et de fiabilité comparables à ceux obtenus pour la méthode d'essai validée, que la méthode d'essai proposée doit présenter lorsqu'on l'évalue à l'aide des produits chimiques de référence de la liste minimale (18).

▼M8

Témoin positif: échantillon contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec une substance connue pour induire une réponse positive. Cet échantillon subit les mêmes procédures que les échantillons traités avec la substance testée et les autres échantillons témoins. Pour permettre d'évaluer la variabilité de la réponse du témoin positif dans le temps, l'ampleur de la réponse positive ne doit pas être excessive.

Pertinence: description de la relation entre l'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité à des fins spécifiques. Elle définit le degré auquel l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (18).

Fiabilité: mesure dans laquelle la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires ainsi que la répétabilité intra-laboratoire (18).

Essai substitutif: essai conçu pour remplacer un essai utilisé en routine et accepté, servant à l'identification des dangers et/ou à l'évaluation de risques, et dont il a été démontré qu'il assure, par rapport à l'essai accepté, une protection équivalente ou accrue de la santé humaine ou animale ou de l'environnement, selon les cas, pour toutes les situations et produits chimiques d'essai possibles (18).

Reproductibilité: accord entre les résultats obtenus lors d'essais pratiqués sur le même produit chimique selon le même mode opératoire (voir «Fiabilité») (18).

Effets réversibles sur l'œil: voir «Irritation oculaire».

EChR: épithélium cornéen humain reconstitué.

Épreuve: consiste à tester un ou plusieurs produits chimiques parallèlement à un témoin négatif et à un témoin positif.

ET: Écart-type.

Sensibilité: proportion des produits chimiques positifs/actifs correctement classés par l'essai. Il s'agit d'une mesure de la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriels, et d'un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (18).

▼M8

Lésion oculaire grave: lésion des tissus oculaires ou dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'un produit chimique d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui n'est pas totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application. Interchangeable avec «Effets irréversibles sur l'œil» et avec «Catégorie 1 du SGH de l'ONU et du règlement CLP».

Mode opératoire normalisé: procédure écrite formelle décrivant en détail les modalités de réalisation en laboratoire de certaines opérations effectuées en routine ou dans le cadre d'un essai particulier. Le respect du mode opératoire normalisé fait partie des bonnes pratiques de laboratoire.

Spécificité: proportion des produits chimiques d'essai négatifs/inactifs qui sont correctement classés par l'essai. Il s'agit d'une mesure de la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriels, et d'un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (18).

Substance: élément chimique et ses composés, présents à l'état naturel ou obtenus grâce à un procédé de production. Ce terme inclut tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit ainsi que toute impureté produite par le procédé utilisé, mais exclut tout solvant pouvant être extrait sans affecter la stabilité ni modifier la composition de la substance.

Essai: consiste à tester en parallèle un même produit chimique sur au minimum deux réplicats de tissus, tel que défini dans le mode opératoire normalisé correspondant.

Viabilité tissulaire: paramètre mesurant l'activité totale d'une population cellulaire dans un modèle tissulaire, définie comme sa capacité à réduire le colorant vital MTT, qui selon l'effet mesuré et le protocole utilisé pour l'essai, est en corrélation avec le nombre total et/ou la vitalité des cellules.

Approche «top-down»: approche en plusieurs étapes appliquée à un produit chimique présumé provoquer des lésions oculaires graves, et dont la première étape consiste à distinguer les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves (résultat positif) des autres produits chimiques (résultat négatif).

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai«».

Stratégie d'essai à plusieurs niveaux: démarche expérimentale séquentielle consistant à examiner toutes les informations existantes sur un produit chimique d'essai dans un ordre déterminé, en ayant recours à chaque étape à un processus d'analyse du poids de la preuve afin de déterminer si les informations disponibles sont suffisantes pour décider d'une classification dans une catégorie de danger, avant de passer à l'étape suivante. Si le danger potentiel ou l'ampleur du danger présenté par un produit chimique d'essai peut être déterminé sur la base des informations existantes à une étape donnée, aucun essai supplémentaire n'est nécessaire (18).

VLSQ: valeur limite supérieure de quantification.

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies): système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans l'objectif de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (1).

Catégorie 1 du SGH de l'ONU et du règlement CLP: voir «Lésion oculaire grave».

Catégorie 2 du SGH de l'ONU et du règlement CLP: voir «Irritation oculaire».

Sans catégorie selon le SGH de l'ONU et règlement CLP: produit chimique ne relevant pas d'une classification dans la catégorie 1 ou 2 du SGH de l'ONU/du règlement CLP (ou dans la catégorie 2A ou 2B du SGH de l'ONU).Terme interchangeable avec «Non classé».

CLUP: chromatographie en phase liquide à ultra-haute performance.

▼**M8**

UVCB: substances de composition inconnue ou variable, produits de réactions complexes ou matériels biologiques.

Méthode d'essai valide: méthode d'essai dont la pertinence et la fiabilité sont jugées satisfaisantes pour des fins spécifiques, et qui repose sur des principes scientifiquement valables. Une méthode d'essai n'est jamais valide dans l'absolu, mais seulement par rapport à une fin particulière (18).

Méthode d'essai validée: Méthode d'essai ayant fait l'objet d'études de validation visant à déterminer sa pertinence (notamment sa précision) et sa fiabilité à des fins spécifiques. Il importe de noter que les performances d'une méthode d'essai validée peuvent être insuffisantes en termes de précision et de fiabilité pour qu'elle soit jugée acceptable pour les besoins envisagés (18).

MRV: Méthode de référence validée.

MRV1: le TIO EpiOcular™ est désigné Méthode de référence validée 1.

MRV2: le TIO HCE SkinEthic™ est désigné Méthode de référence validée 2.

Poids de la preuve: Prise en compte des atouts et des faiblesses de divers éléments d'information en vue d'aboutir à une conclusion concernant le danger potentiel d'un produit chimique d'essai et d'étayer cette conclusion.

▼M8

Appendice 2

PRINCIPAUX ÉLÉMENTS DES ESSAIS SUR ECHR VALIDÉS POUR L'IDENTIFICATION DE PRODUITS CHIMIQUES NE NÉCESSITANT AUCUNE CLASSIFICATION NI ÉTIQUETAGE POUR IRRITATION OCULAIRE OU LÉSIONS OCULAIRES GRAVES

Éléments de l'essai	TIO EpiOcular™ (MRV1)		TIO HCE SkinEthic™ (MRV2)	
Protocoles	Liquides (applicables à la pipette à 37±1°C ou à des températures inférieures pendant 15 min)	Solides (non applicables à la pipette)	Liquides et visqueux (applicables à la pipette)	Solides (non applicables à la pipette)
Surface du modèle	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Nombre de réplicats de tissus	Au moins 2	Au moins 2	Au moins 2	Au moins 2
Pré-vérification des interférences de couleur	50 µl + 1 ml H_2O pendant 60 min à 37±2°C, sous CO_2 5±1 %, HR ≥ 95 %(produits chimiques d'essai incolores), ou 50 µl + 2 ml isopropanol mélangés pendant 2-3 h à TA (produits chimiques d'essai colorés) → si la DO du produit chimique d'essai à 570±20 nm, après soustraction de la DO de l'isopropanol ou de l'H_2O, est > 0,08 (soit approximativement 5 % de la DO moyenne du témoin négatif), il convient de réaliser des essais avec des témoins vivants adaptés.	50 mg + 1 ml H_2O pendant 60 min à 37±2°C, sous CO_2 5±1 %, HR ≥ 95 %(produits chimiques d'essai incolores), et/ou 50 mg + 2 ml isopropanol mélangés pendant 2-3 h à TA (produits chimiques d'essai colorés et non colorés) → si la DO du produit chimique d'essai à 570±20 nm, après soustraction de la DO de l'isopropanol ou de l'H_2O, est > 0.08 (soit approximativement 5 % de la DO moyenne du témoin négatif), il convient de réaliser des essais avec des témoins vivants adaptés.	10 µl + 90 µl H_2O mélangés pendant 30±2 min à température ambiante (TA, 18-28°C) → si le produit chimique d'essai est coloré, il convient de réaliser des essais avec des témoins vivants adaptés.	10 mg + 90 µl H_2O mélangés pendant 30±2 min à TA → si le produit chimique d'essai est coloré, il convient de réaliser des essais avec des témoins vivants adaptés.

▼M8

Éléments de l'essai	TIO EpiOcular™ (MRV1)		TIO HCE SkinEthic™ (MRV2)	
Pré-vérification de la réduction directe du MTT	50 µl + 1 ml solution de MTT à 1 mg/ml pendant 180±15 min à 37±2°C, sous CO_2 5±1 %, HR ≥ 95 % → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus tués par congélation (50 µl d'eau distillée stérile dans une solution de MTT servent de témoin négatif)	50 mg + 1 ml solution de MTT à 1 mg/ml pendant 180±15 min à 37±2°C, sous CO_2 5±1 %, HR ≥ 95 % → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus tués par congélation (50 µl d'eau distillée stérile dans une solution de MTT servent de témoin négatif)	30 µl + 300 µl solution de MTT à 1 mg/ml pendant 180±15 min à 37±2°C, sous CO_2 5±1 %, HR ≥ 95 % → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus tués dans l'eau (30 µl d'eau distillée stérile dans une solution de MTT servent de témoin négatif)	30 mg + 300 µl solution de MTT à 1 mg/ml pendant 180±15 min à 37±2°C, sous CO_2 5±1 %, HR ≥ 95 % → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus tués dans l'eau (30 µl d'eau distillée stérile dans une solution de MTT servent de témoin négatif)
Pré-traitement	20 µl DPBS sans Ca^{2+}/Mg^{2+} pendant 30±2 min à 37±2°C, sous CO_2 5±1 %, HR ≥ 95 %, à l'abri de la lumière.	20 µl DPBS sans Ca^{2+}/Mg^{2+} pendant 30±2 min à 37±2°C, sous CO_2 5±1 %, HR ≥ 95 %, à l'abri de la lumière.	—	—
Doses et application du traitement	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) mesurés avec un outil calibré (une cuillère calibrée pour contenir 50 mg de chlorure de sodium, par exemple).	10 µl DPBS sans Ca^{2+}/Mg^{2+} + 30±2 µl (60 µl/cm^2) Pour les produits visqueux, utiliser du tulle de nylon	30 µl DPBS sans Ca^{2+}/Mg^{2+} + 30±2 mg (60 mg/cm^2)
Temps d'exposition et température	30 min (±2 min) dans un milieu de culture à 37±2°C, sous CO_2 5±1 %, HR ≥ 95 %	6 heures (±0,25 h) dans un milieu de culture à 37±2°C, sous CO_2 5±1 %, HR ≥ 95 %	30 min (±2 min) dans un milieu de culture à 37±2°C, sous CO_2 5±1 %, HR ≥ 95 %	4 heures (±0,1 h) dans un milieu de culture à 37±2°C, sous CO_2 5±1 %, HR ≥ 95 %
Rinçage à température ambiante	3 fois dans 100 ml de DPBS sans Ca^{2+}/Mg^{2+}	3 fois dans 100 ml de DPBS sans Ca^{2+}/Mg^{2+}	20 ml DPBS sans Ca^{2+}/Mg^{2+}	25 ml DPBS sans Ca^{2+}/Mg^{2+}
Immersion post-traitement	12 min (±2 min) à TA dans un milieu de culture	25 min (±2 min) à TA dans un milieu de culture	30 min (±2 min) à 37±2°C, sous CO_2 5 %, HR ≥ 95 % dans un milieu de culture	30 min (±2 min) à TA dans un milieu de culture

▼M8

Éléments de l'essai	TIO EpiOcular™ (MRV1)		TIO HCE SkinEthic™ (MRV2)	
Incubation post-traitement	120 min (±15 min) à 37±2°C, sous CO_2 5±1 %, HR ≥ 95 % dans un milieu de culture	18 h (±0.25 h) à 37±2°C, sous CO_2 5±1 %, HR ≥ 95 % dans un milieu de culture	Aucune	18 h (±0,5 h) à 37±2°C, sous CO_2 5±1 %, HR ≥ 95 % dans un milieu de culture
Témoin négatif	50 µl H_2O Testé en parallèle	50 µl H_2O Testé en parallèle	30±2 µl DPBS sans Ca^{2+}/Mg^{2+} Testé en parallèle	30±2 µl DPBS sans Ca^{2+}/Mg^{2+} Testé en parallèle
Témoin positif	50 µl acétate de méthyle Testé en parallèle	50 µl acétate de méthyle Testé en parallèle	30±2 µl acétate de méthyle Testé en parallèle	30±2 µl acétate de méthyle Testé en parallèle
Solution MTT	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Durée et température d'incubation du MTT	180 min (±15 min) à 37±2°C, sous CO_2 5±1 %, HR ≥ 95 %	180 min (±15 min) à 37±2°C, sous CO_2 5±1 %, HR ≥ 95 %	180 min (±15 min) à 37±2°C, sous CO_2 5±1 %, HR ≥ 95 %	180 min (±15 min) à 37±2°C, sous CO_2 5±1 %, HR ≥ 95 %
Solvant d'extraction	2 ml isopropanol (extraction depuis le dessus et le dessous de l'insert en perçant le tissu)	2 ml isopropanol (extraction depuis le dessous de l'insert en perçant le tissu)	1,5 ml isopropanol (extraction depuis le dessus et le dessous de l'insert)	1,5 ml isopropanol (extraction depuis le dessous de l'insert)
Durée et température d'extraction	2-3 h en agitant (~120 rpm) à TA ou une nuit à 4-10°C	2-3 h en agitant (~120 rpm) à TA ou une nuit à 4-10°C	4 h en agitant (~120 rpm) à TA ou au moins une nuit sans agiter à 4-10°C	Au moins 2 h en agitant (~120 rpm) à TA
Lecture de la DO	570 nm (550 - 590 nm) sans filtre de référence	570 nm (550-590 nm) sans filtre de référence	570 nm (540 - 600 nm) sans filtre de référence	570 nm (540 - 600 nm) sans filtre de référence
Contrôle de qualité des tissus	Traitement par 100 µl de Triton X-100 à 0,3 % (v/v) 12,2 min ≤ TE_{50} ≤ 37,5 min	Traitement par 100 µl de Triton X-100 à 0,3 % (v/v) 12,2 min ≤ TE_{50} ≤ 37,5 min	Traitement de 30 min par SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ CI_{50} ≤ 3,5 mg/ml	Traitement de 30 min par SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ CI_{50} ≤ 3,2 mg/ml

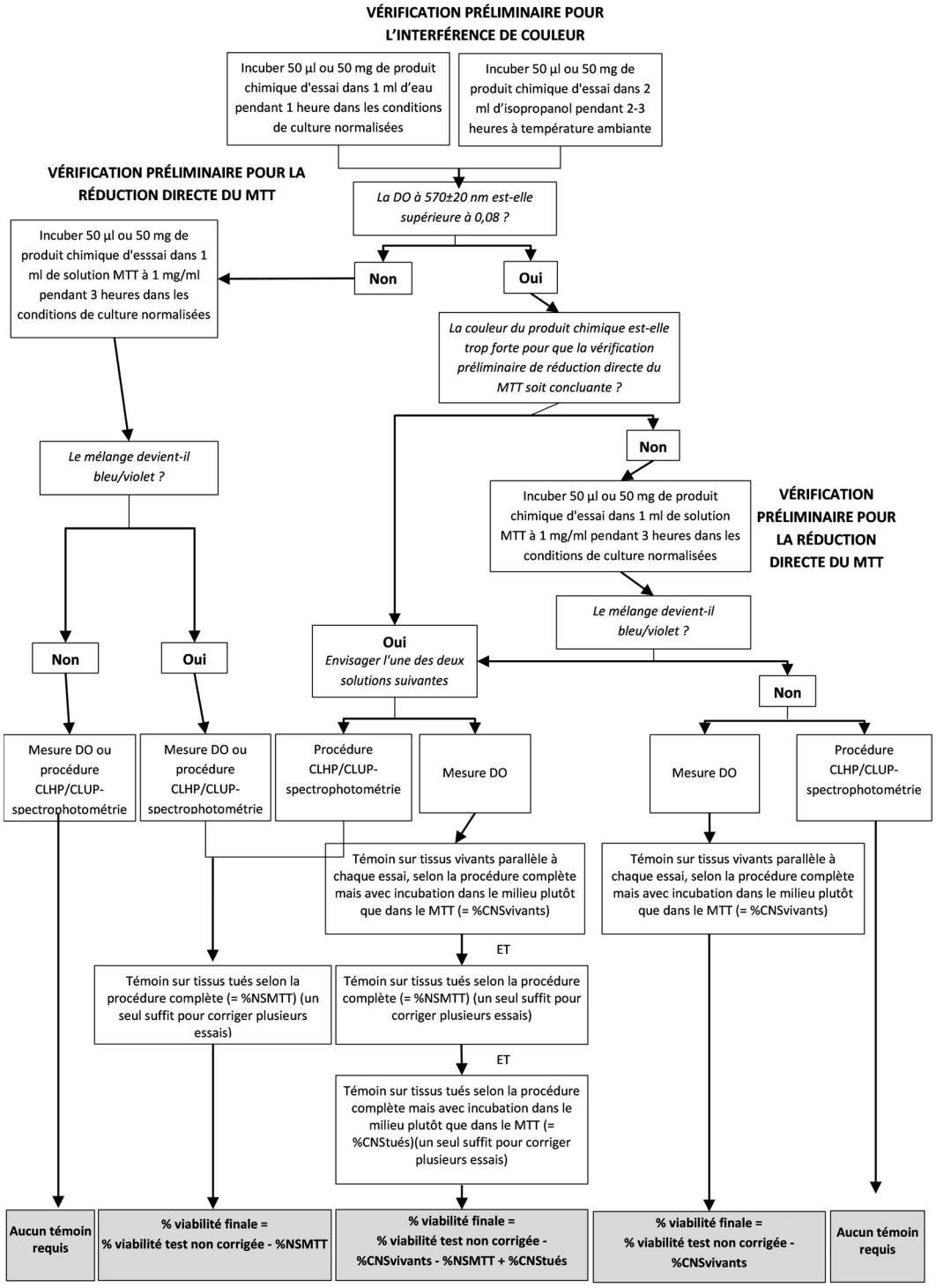
▼M8

Éléments de l'essai	TIO EpiOcular™ (MRV1)		TIO HCE SkinEthic™ (MRV2)	
Critères d'acceptabilité	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif doit être > 0,8 et < 2,5 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 30 min au témoin positif, exprimée en % du témoin négatif, doit être < 50 % 3. La différence de viabilité entre les deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 20 %.	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif doit être > 0,8 et < 2,5 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 6 heures au témoin positif, exprimée en % du témoin négatif, doit être < 50 % 3. La différence de viabilité entre les deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 20 %.	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif doit être > 1,0 et ≤ 2,5 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 30 min au témoin positif, exprimée en % du témoin négatif, doit être ≤ 30 % 3. La différence de viabilité entre les deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 20 %.	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif doit être > 1,0 et ≤ 2,5 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 4 heures au témoin positif, exprimée en % du témoin négatif, doit être ≤ 20 % 3. La différence de viabilité entre les deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 20 %.

▼**M8**

Appendice 3

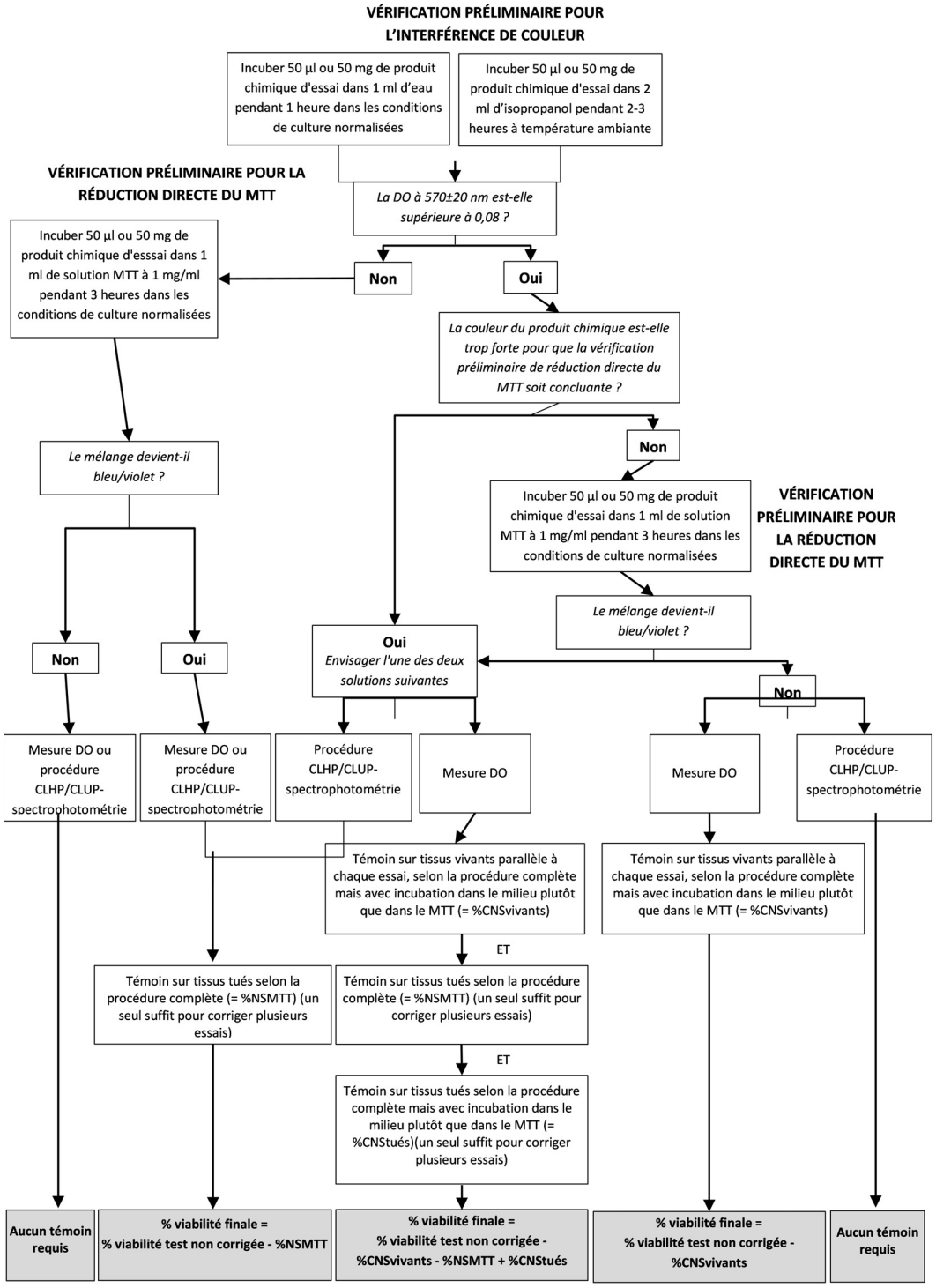
LOGIGRAMME ILLUSTRATIF PRÉSENTANT UNE SUGGESTION DE PROCÉDURE POUR L'IDENTIFICATION ET LA PRISE EN COMPTE DES PRODUITS CHIMIQUES D'ESSAI RÉDUCTEURS DIRECTS DU MTT ET/OU CAUSANT UNE INTERFÉRENCE DE COULEURS, SUR LA BASE DU MODE OPÉRATOIRE NORMALISÉ DE LA MRV1



▼**M8**

Appendice 4

LOGIGRAMME ILLUSTRATIF PRÉSENTANT UNE SUGGESTION DE PROCÉDURE POUR L'IDENTIFICATION ET LA PRISE EN COMPTE DES PRODUITS CHIMIQUES D'ESSAI RÉDUCTEURS DIRECTS DU MTT ET/OU CAUSANT UNE INTERFÉRENCE DE COULEURS, SUR LA BASE DU MODE OPÉRATOIRE NORMALISÉ DE LA MRV2



▼**M8**

Appendice 5

PRINCIPAUX PARAMÈTRES ET CRITÈRES D'ACCEPTATION DE LA PREUVE D'EFFICACITÉ D'UN SYSTÈME CLHP/CLUP-SPECTROPHOTOMÉTRIE POUR LA MESURE DU FORMAZAN EXTRAIT D'UN MODÈLE TISSULAIRE D'EChR

Paramètre	Protocole dérivé des recommandations de la FDA (36)(38)	Critères d'acceptation
Sélectivité	Analyse de l'isopropanol, du blanc vivant (extrait de modèle tissulaire d'EChR vivant sans traitement dans l'isopropanol), blanc tué (extrait de modèle tissulaire d'EChR tué sans traitement dans l'isopropanol), et d'un colorant (bleu de méthylène, par exemple)	$Surface_{interférence} \leq 20\ \%\ Surface_{VLIQ}$ ([1])
Fidélité	Contrôles de qualité (c'est-à-dire, bleu de formazan à 1,6 µg/ml, 16 µg/ml et 160 µg/ml) dans l'isopropanol (n=5)	CV ≤ 15 % ou ≤ 20 % pour la VLIQ
Justesse	Contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=5)	% Écart ≤ 15 % ou ≤ 20 % pour la VLIQ
Effet de matrice	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=5)	Effet de matrice compris entre 85 % et 115 %
Effet résiduel	Analyse de l'isopropanol après une VLSQ ([2]) normale	Surfaceinterférence ≤ 20 % SurfaceVLIQ
Répétabilité (même jour)	3 courbes d'étalonnage indépendantes (établies sur la base de 6 dilutions de formazan au 1/3 consécutives dans l'isopropanol, avec point de départ VLSQ, soit 200 µg/ml); contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=5)	Courbes d'étalonnage: % Écart ≤ 15 % ou ≤ 20 % pour la VLIQ Contrôles de qualité: %Écart ≤ 15 % et CV ≤ 15 %
Reproductibilité (d'un jour à l'autre)	Jour 1: 1 courbe d'étalonnage et contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3) Jour 2: 1 courbe d'étalonnage et contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3) Jour 3: 1 courbe d'étalonnage et contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3)	
Stabilité à court terme du formazan dans un extrait tissulaire d'EChR	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=3) analysé le jour de la préparation et après une conservation de 24 heures à température ambiante	% Écart ≤ 15 %
Stabilité à long terme du formazan dans un extrait tissulaire d'EChR, si nécessaire	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=3) analysé le jour de la préparation et après une conservation de plusieurs jours à -20°C	% Écart ≤ 15 %

([1]) VLIQ: valeur limite inférieure de quantification, définie comme correspondant à une viabilité tissulaire de 1-2 %, soit 0,8 µg/ml.

([2]) VLSQ: valeur limite supérieure de quantification, définie comme au moins deux fois la concentration maximale attendue de formazan dans les extraits d'isopropanol issus des témoins négatifs (~70 µg/ml selon la MRV), soit 200 µg/ml.

▼M8

B.70. **ESSAIS *IN VITRO* FAISANT APPEL AU RÉCEPTEUR D'ŒSTROGÈNE RECOMBINANT HUMAIN (HRER) POUR LA DÉTECTION DES PRODUITS CHIMIQUES AYANT UNE AFFINITÉ DE LIAISON AVEC LES RÉCEPTEURS DES ŒSTROGÈNES**

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Ligne directrice d'essai de l'OCDE axée sur la performance

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 493 (2015) de l'OCDE. La ligne directrice 493 pour les essais de produits chimiques est axée sur la performance (LDAP) et décrit la méthodologie des essais *in vitro* faisant appel au récepteur d'œstrogène recombinant humain pour la détection des substances ayant une affinité de liaison avec les récepteurs des œstrogènes (essais de liaison au hrER). Elle comprend deux essais structurellement et fonctionnellement similaires pour détecter les ligands des récepteurs des œstrogènes (ERα), et doit faciliter l'élaboration de nouveaux essais similaires ou modifiés, conformément aux principes de validation exposés dans le document d'orientation de l'OCDE intitulé *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment* (1). Les méthodes d'essai de référence totalement validées (appendices 2 et 3) qui sont à la base de la présente méthode d'essai axée sur la performance sont les suivantes:

— Essai de Freyberger-Wilson (FW): essai *in vitro* de liaison aux récepteurs des œstrogènes (ER) à l'aide d'un ERα humain intégral (2), et

— Essai du Chemical Evaluation and Research Institute (CERI): essai *in vitro* de liaison aux récepteurs des œstrogènes à l'aide du domaine de liaison du ligand d'un ER recombinant humain (2).

Des normes de performance (3) sont disponibles afin de faciliter l'élaboration et la validation d'essais similaires visant le même paramètre de sécurité, et elles permettent de modifier la ligne directrice 493 en temps utile par l'ajout de nouveaux essais similaires. L'ajout de tels nouveaux essais similaires n'est toutefois possible qu'après examen et vérification, par l'OCDE, du respect des normes de performance. Chacun des essais inclus dans la ligne directrice 493 peut être utilisé pour répondre aux exigences des pays membres de l'OCDE en matière d'essai de liaison aux ER, dans le cadre du système d'acceptation mutuelle de données de l'OCDE.

Contexte et principes des essais inclus dans la présente méthode d'essai

2. L'OCDE a lancé en 1998 une activité à caractère hautement prioritaire visant à réviser les lignes directrices existantes ou à établir de nouvelles lignes directrices pour la détection et les essais de substances susceptibles d'avoir des effets perturbateurs sur le système endocrinien. Le Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens (CC) a été révisé en 2012. Les versions originale et révisée de ce CC figurent en tant qu'annexes dans le document d'orientation sur les lignes directrices normalisées pour évaluer l'effet perturbateur des produits chimiques sur le système endocrinien (4). Le CC comprend cinq niveaux, chacun d'entre eux correspondant à un degré différent de complexité biologique. Les essais de liaison aux ER décrits dans cette méthode d'essai correspondent au niveau 2, qui couvre «*les essais* in vitro *fournissant des données sur certains mécanisme(s) et voie(s) d'activité endocrinienne*». La présente méthode d'essai vise les essais in vitro de liaison aux récepteurs conçus pour détecter les ligands du récepteur des œstrogènes alpha (ERα) chez l'humain.

▼**M8**

3. La pertinence de l'essai de liaison aux ER *in vitro* à l'égard des fonctions biologiques a été clairement démontrée. Les essais de liaison aux ER sont conçus pour détecter les produits chimiques susceptibles de perturber les voies d'activité liées à l'hormone œstrogène. Cela fait vingt ans qu'ils sont largement utilisés pour caractériser la distribution tissulaire des ER et pour déterminer les agonistes et les antagonistes de ces récepteurs. Ces essais reposent sur l'interaction ligand-récepteur, qui constitue la première étape de la voie de signalisation des œstrogènes, essentielle aux fonctions reproductives chez l'ensemble des vertébrés.

4. L'interaction des œstrogènes et des ER peut affecter la transcription des gènes régulés par les œstrogènes et avoir des conséquences au-delà du génome en entraînant l'induction ou l'inhibition de processus cellulaires, notamment les mécanismes nécessaires à la prolifération cellulaire, au développement normal du fœtus et aux fonctions reproductives (5) (6) (7). La perturbation des systèmes œstrogéniques normaux pourrait déclencher des troubles du développement (ontogenèse) et nuire à la santé génésique et à l'intégrité du système reproductif. Une mauvaise signalisation des ER peut notamment se traduire par un risque accru de cancer hormonodépendant, des troubles de la fertilité ainsi que des altérations de la croissance et du développement du fœtus (8).

5. Les essais de liaison *in vitro* reposent sur l'interaction directe entre une substance et le domaine de liaison du ligand spécifique d'un récepteur qui régule la transcription d'un gène. L'essai de liaison au récepteur des œstrogènes alpha recombinant humain (hrERα) consiste principalement à mesurer la capacité d'un ligand radiomarqué (le [^{3}H]-17β-œstradiol) à se lier aux ER en présence de concentrations croissantes du produit chimique d'essai (appelé «compétiteur»). Les produits chimiques d'essai qui présentent une forte affinité de liaison avec les ER entrent en concurrence avec le ligand radiomarqué à une concentration plus faible que les composés ayant une affinité moindre vis-à-vis du récepteur. L'essai comporte deux grands éléments: une expérience de liaison à saturation pour établir les paramètres de l'interaction récepteur-ligand et documenter la spécificité des liaisons aux ER, puis une expérience de liaison compétitive visant à déterminer dans quelle mesure un produit chimique d'essai fait concurrence à un ligand radiomarqué pour se fixer aux ER.

6. Les études de validation des méthodes de liaison du CERI et de FW ont démontré la pertinence et la fiabilité de ces essais aux fins prévues (2).

7. Les définitions et abréviations utilisées dans cette méthode d'essai sont présentées à l'appendice 1.

Portée et limites des essais de liaison aux récepteurs

8. Ces essais sont proposés à des fins de détection et de priorisation, mais ils peuvent aussi livrer des informations sur l'événement d'initiation moléculaire (EIM) utiles dans le cadre d'une approche fondée sur le poids de la preuve. Ils s'appuient sur l'établissement d'une liaison chimique avec le domaine de liaison du ligand des ERα dans un système in vitro. Aussi les résultats obtenus ne doivent-ils pas être directement extrapolés aux mécanismes complexes de signalisation et de régulation qui caractérisent un système endocrinien intact in vivo.

▼**M8**

9. La liaison du ligand naturel 17β-œstradiol aux ER est la première étape d'une série d'événements moléculaires qui activent la transcription des gènes cibles, et se traduisent in fine par un changement physiologique (9). Cet amarrage au domaine de liaison du ligand des ERα est donc considéré comme l'un des mécanismes clés de la perturbation endocrinienne (PE) médiée par les ER, bien que la PE puisse procéder par d'autres mécanismes, notamment: (i) des interactions avec des parties des ERα autres que le site de lianison du ligand, (ii) des interactions avec d'autres récepteurs jouant sur la signalisation des œstrogènes, les ERβ et les ER couplés aux protéines G ainsi que d'autres récepteurs et systèmes enzymatiques du système endocrinien, (iii) la synthèse hormonale, (iv) l'activation et/ou l'inactivation métaboliques des hormones, (v) la distribution des hormones dans les tissus cibles, et (vi) l'élimination des hormones de l'organisme. Aucun des essais visés par la présente méthode d'essai ne porte sur ces modes d'action.

10. La présente méthode d'essai repose sur la capacité de substances à se lier aux ERα humains, et n'opère pas de distinction entre les agonistes et les antagonistes des ERα. Ces essais n'abordent pas non plus les événements déclenchés par cette liaison, comme la transcription des gènes ou les changements physiologiques. Étant donné que l'étude de validation n'a porté que sur des substances mono-constituant, il n'existe aucune information quant à l'applicabilité de l'essai aux mélanges. Cela étant, ces essais demeurent théoriquement applicables à l'évaluation de mélanges ou de substances multi-constituants. Avant de mettre en œuvre la présente méthode d'essai sur un mélange afin de dégager des données à des fins réglementaires, il convient d'examiner si, et le cas échéant pourquoi, ladite méthode peut fournir des résultats adéquats aux fins visées. Ces questions ne se posent pas quand la réglementation exige de réaliser l'essai sur le mélange.

11. Les systèmes de récepteurs hors cellule n'ont intrinsèquement aucune compétence métabolique et n'ont pas été validés en combinaison avec des systèmes enzymatiques métaboliques. Il serait toutefois possible d'intégrer l'activité métabolique dans la conception de l'étude, sous réserve de nouveaux travaux de validation.

12. Concernant les produits chimiques susceptibles de dénaturer les protéines (telles que celles qui constituent le récepteur), comme les tensioactifs, ou les produits chimiques modifiant le pH de la solution d'essai tamponnée, l'essai peut ne pas convenir, ou bien à des concentrations d'essai auxquelles ces interactions n'apparaissent pas. Dans les autres cas, la fourchette de concentrations d'essai d'un produit chimique est plafonnée par sa solubilité dans la solution d'essai tamponnée.

13. À titre d'information, le tableau 1 fournit les résultats des essais des 24 substances testées avec les deux essais totalement validés décrits dans la présente méthode d'essai. Parmi ces substances, 17 sont classées comme ligands des ER et 6 comme non-ligands d'après les rapports publiés, notamment sur les essais in vitro d'activation transcriptionnelle et/ou les essais utérotrophiques (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). S'agissant des données résumées dans le tableau 1, les deux essais ont presque abouti aux mêmes conclusions pour l'ensemble des substances jusqu'à 10^{-4} M, et chaque composé a été classé correctement comme ligand ou non-ligand des ER. D'autres renseignements sur ce groupe de produits chimiques ainsi que sur les substances supplémentaires testées dans les essais de liaison aux ER dans le cadre des études de validation sont fournis dans les normes de performance pour les essais de liaison au hrER (3) à l'appendice 2 (tableaux 1, 2 et 3).

▼M8

Tableau 1

Classification des substances comme ligand ou non-ligand des ER à l'issue d'essais de liaison au hrER d'après les méthodes de FW et du CERI, et comparaison avec la réponse attendue

	Nom de la substance	N° CAS	Réponse attendue	Essai FW		Essai CERI		Classe chimique dans le système MESH Classe	Classe du produit
				Fourchette de concentrations (M)	Classification	Fourchette de concentrations (M)	Classification		
1	17β-œstradiol (E2)	50-28-2	*Ligand*	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Ligand	$1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$	Ligand	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
2	Noréthynodrel	68-23-5	*Ligand*	$3 \times 10^{-9} – 30 \times 10^{-4}$	Ligand	$3 \times 10^{-9} – 30 \times 10^{-4}$	Ligand	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
3	Noréthindrone	68-22-4	*Ligand*	$3 \times 10^{-9} – 30 \times 10^{-4}$	Ligand	$3 \times 10^{-9} – 30 \times 10^{-4}$	Ligand	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
4	Phtalate de dibutyle	84-74-2	*Non-ligand* (*)	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-4}$	Non-ligand (**) (+)	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-4}$	Non-ligand (**) (+)	Hydrocarbure (cyclique), ester	Plastifiant, intermédiaire chimique
5	DES	56-53-1	*Ligand*	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Ligand	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Ligand	Hydrocarbure (cyclique), phénol	Produit pharmaceutique et vétérinaire
6	17α-éthynylœstradiol	57-63-6	*Ligand*	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Ligand	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Ligand	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
7	méso-hexestrol	84-16-2	*Ligand*	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Ligand	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Ligand	Hydrocarbure (cyclique), phénol	Produit pharmaceutique et vétérinaire
8	Génistéine	446-72-0	*Ligand*	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Ligand	$1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$	Ligand	Hydrocarbure (hétérocyclique), flavonoïde	Produit naturel

▼M8

	Nom de la substance	N° CAS	Réponse attendue	Essai FW		Essai CERI		Classe chimique dans le système MESH Classe	Classe du produit
				Fourchette de concentrations (M)	Classification	Fourchette de concentrations (M)	Classification		
9	Équol	531-95-3	*Ligand*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligand	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligand	Métabolite des phytœstrogènes	Produit naturel
10	Butylparabène (*n*-butyl-4-hydroxybenzoate)	94-26-8	*Ligand*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligand	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligand	Paraben	Conservateur
11	Nonylphénol (mélange)	84852-15-3	*Ligand*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligand	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligand	Alkylphénol	Composé intermédiaire
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*Ligand*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligand	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligand	Organochlorine	Insecticide
13	Corticostérone	50-22-6	*Non-ligand* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Non-ligand	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Non-ligand	Stéroïde	Produit naturel
14	Zéaralénone	17924-92-4	*Ligand*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligand	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligand	Hydrocarbure (hétérocyclique), lactone	Produit naturel
15	Tamoxifène	10540-29-1	*Ligand*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligand	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligand	Hydrocarbure (cyclique)	Produit pharmaceutique et vétérinaire
16	5α-dihydrotestostérone	521-18-6	*Ligand*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligand	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligand	Stéroïde, non phénolique	Produit naturel
17	Bisphénol A	80-05-7	*Ligand*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligand	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligand	Phénol	Intermédiaire chimique
18	4-*n*-heptylphénol	1987-50-4	*Ligand*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Équivoque (a)	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligand	Alkylphénol	Intermédiaire

▼M8

	Nom de la substance	N° CAS	Réponse attendue	Essai FW		Essai CERI		Classe chimique dans le système MESH Classe	Classe du produit
				Fourchette de concentrations (M)	Classification	Fourchette de concentrations (M)	Classification		
19	Képone (chlordécone)	143-50-0	*Ligand*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligand	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligand	Hydrocarbure (halogéné)	Pesticide
20	Benz(a)anthracène	56-55-3	*Non-ligand*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Non-ligand ([b])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Non-ligand ([b])	Hydrocarbure aromatique	Intermédiaire
21	Entérolactone	78473-71-9	*Ligand*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligand	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligand	Phytœstrogène	Produit naturel
22	Progestérone	57-83-0	*Non-ligand* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Non-ligand	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Non-ligand	Stéroïde	Produit naturel
23	Octyltriéthoxysilane	2943-75-1	*Non-ligand*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Non-ligand	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Non-ligand	Silane	Modificateur de surface
24	Atrazine	1912-24-9	*Non-ligand* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Non-ligand	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Non-ligand	Composé hétérocyclique	Herbicide

(*) Limite de solubilité < 1 × 10–4 M.

(**) L'utilisation et la classification du phtalate de dibutyle (DBP) en tant que non-ligand reposent sur un essai de concentrations allant jusqu'à 10^{-4} M, car au cours des études de prévalidation, certains laboratoires ont observé que la substance était insoluble à 10^{-3} M (p.ex. apparition d'un trouble).

(+) Pendant l'étude de validation, le phtalate de dibutyle (DBP) a fait office de substance d'essai codée à des concentrations allant jusqu'à 10^{-3} M. Dans ces conditions, certains laboratoires ont observé une baisse des liaisons du ligand radiomarqué à la concentration maximale (10^{-3} M) et/ou un ajustement de la courbe incertain. Ces essais ont abouti à la classification du DBP comme «équivoque» ou «ligand» dans les 3/5 des laboratoires utilisant la méthode du CERI et dans les 5/6 des laboratoires appliquant la méthode de FW (voir référence (2), sections IV.B.3a,b et VI.A).

([a]) La classification obtenue n'est pas celle qui était attendue. La classification du 4-n-heptylphénol comme «équivoque» ou «non-ligand» par les 3/5 des laboratoires a donné lieu en moyenne à une classification en tant qu'équivoque. À y regarder de plus près, il s'avère que ce résultat s'explique par des limites de solubilité chimique qui n'ont pas permis de produire une courbe de liaison complète.

([b]) Pendant l'étude de validation, le benz(a)anthracène a été reclassé comme non-ligand (c'est-à-dire négatif) d'après des publications démontrant que l'activité œstrogénique in vitro signalée pour cette substance (16) dépend principalement de son activation métabolique (17) (18). Il ne devrait pas y avoir d'activation métabolique enzymatique de cette substance dans les essais de liaison au hrER hors cellule comme ceux de l'étude de validation interlaboratoires. Ainsi, la classification correcte de cette substance est «non-ligand» lorsqu'elle est utilisée dans les conditions expérimentales des essais de FW et du CERI.

▼M8

ÉLÉMENTS DE LESSAI DE LIAISON AU hrER

Éléments essentiels de l'essai

14. La présente méthode d'essai concerne les essais faisant appel à un récepteur des œstrogènes et à un ligand de ce récepteur qui présente une affinité de liaison suffisamment forte. Ce ligand doit servir de marqueur ou traceur de l'essai et être remplacé par le produit chimique d'essai quand la concentration de celui-ci augmente. Les essais de liaison se composent des deux grands éléments suivants: 1) liaison à saturation et 2) liaison compétitive. L'essai de liaison à saturation sert à confirmer la spécificité et l'activité des préparations de récepteurs, tandis que l'essai de liaison compétitive permet d'évaluer la capacité du produit chimique d'essai à se lier au hrER.

Témoins

15. Il convient de détailler pourquoi les témoins et la substance œstrogénique de référence concomitants ont été choisis. L'essai de liaison compétitive requiert, le cas échéant, un témoin avec solvant (véhicule), un témoin positif (ligand des ER; affinité forte et faible) et un témoin négatif (non-ligand). Ces témoins attestent du bon fonctionnement de l'essai dans les conditions de l'essai et fournissent des éléments de comparaison d'une expérience à l'autre; ils font généralement partie des critères d'acceptabilité d'une expérience donnée (1). Pour chaque essai, une même plaque sert à établir les courbes pour toutes les concentrations de la substance œstrogénique de référence et des témoins (ligand faible et non-ligand). Toutes les autres plaques doivent contenir: 1) une concentration élevée (remplaçant presque entièrement le ligand radiomarqué) et une concentration moyenne (correspondant environ à la CI50) d'E2 et du ligand faible, en triple exemplaire; 2) des témoins avec solvant et des ligands non spécifiques, chacun en triple exemplaire.

Procédures standard de contrôle de qualité

16. Il convient de suivre les procédures standard de contrôle de qualité décrites pour chaque essai afin de garantir que les récepteurs sont actifs, que les concentrations chimiques sont correctes, que l'intervalle de tolérance reste stable au fil des multiples réplications de l'essai, et que l'essai permet toujours d'établir les liaisons aux ER attendues au fil du temps.

Démonstration des compétences du laboratoire

17. Avant de soumettre des produits chimiques inconnus à l'un des essais relevant de la présente méthode d'essai, chaque laboratoire devra démontrer qu'il peut le mettre en œuvre en effectuant des essais à saturation pour confirmer la spécificité et l'activité de la préparation de récepteurs ainsi que des essais de liaison compétitive avec la substance œstrogénique de référence et les témoins (ligand faible et non-ligand). Chaque laboratoire doit ainsi créer une base de données compilant les résultats obtenus pour la substance œstrogénique de référence et les témoins à l'issue de 3 à 5 expériences indépendantes qui ne sont pas réalisées le même jour. Ces expériences constituent un fondement historique pour le laboratoire concernant les témoins et la substance œstrogénique de référence, et permettent d'évaluer partiellement l'acceptabilité des futurs essais.

18. La réactivité du système d'essai sera également confirmée en testant les substances d'épreuve de compétence énumérées dans le tableau 2. La liste des substances d'épreuve de compétence constitue une sous-catégorie des substances de référence indiquées dans les normes de performance des essais de liaison aux ER (3). Ces substances sont disponibles dans le commerce, représentent les classes de produits chimiques auxquelles on prête généralement une affinité de liaison aux ER, et manifestent une gamme d'activité correspondant aux affinités attendues des ligands des ER (de faible à forte) et des non-ligands des ER (négatifs). Pour chaque substance d'épreuve de compétence, les concentrations analysées doivent couvrir la fourchette indiquée dans le tableau 2. Il faut réaliser au moins trois expériences pour chaque substance, dont les résultats doivent correspondre à l'activité chimique attendue. Chaque expérience est réalisée indépendamment en utilisant de nouvelles dilutions du récepteur, des produits chimiques et du réactif, avec trois réplicats par concentration. La compétence est démontrée lorsque chaque substance d'épreuve de compétence est correctement classée (réponse positive/négative). L'épreuve de compétence est effectuée par chaque technicien dans le cadre de la formation aux essais.

▼M8

Tableau 2

Liste des témoins et des substances d'épreuve de compétence pour les essais de liaison compétitive au hrER (1)

N°	Nom de la substance	N° CAS (2)	Réponse attendue (3) (4)	Fourchette de concentrations de l'essai(M)	Classe chimique dans le système MeSH (5)	Type de produit (6)
Controls (Reference estrogen, weak binder, non-binder)						
1	17β-estradiol	50-28-2	Ligand	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
2	Noréthynodrel (or) Noréthindrone	68-23-5 (or) 68-22-4	Ligand	3×10^{-9} – 30×10^{-6}	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
3	Octyltriéthoxysilane	2943-75-1	Non-ligand	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Silane	Modificateur de surface
Substances d'épreuve de compétence (6)						
4	Diéthylstilbestrol	56-53-1	Ligand	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Hydrocarbure (cyclique), phénol	Produit pharmaceutique et vétérinaire
5	17α-éthynylestradiol	57-63-6	Ligand	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
6	méso-Hexestrol	84-16-2	Ligand	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Hydrocarbure (cyclique), phénol	Produit pharmaceutique et vétérinaire
7	Tamoxifène	10540-29-1	Ligand	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Hydrocarbure (cyclique)	Produit pharmaceutique et vétérinaire
8	Génistéine	446-72-0	Ligand	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Composé hétérocyclique, flavonoïde	Produit naturel
9	Bisphénol A	80-05-7	Ligand	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Phénol	Intermédiaire chimique
10	Zéaralonone	17924-92-4	Ligand	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Composé hétérocyclique, lactone	Produit naturel

▼M8

N°	Nom de la substance	N° CAS (2)	Réponse attendue (3) (4)	Fourchette de concentrations de l'essai(M)	Classe chimique dans le système MeSH (5)	Type de produit (6)
11	Butylparabène	94-26-8	Ligand	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Acide carboxylique, phénol	Conservateur
at	Atrazine	1912-24-9	Non-ligand	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Composé hétérocyclique	Herbicide
13	Phatalate de dibutyle (DBP) (7)	84-74-2	Non-ligand (8)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Hydrocarbure (cyclique), ester	Plastifiant, intermédiaire chimique
14	Corticostérone	50-22-6	Non-ligand	1×10^{-11} – 1×10^{-4}	Stéroïde	Produit naturel

(1) Si une substance d'épreuve de compétence n'est plus commercialement disponible, on peut utiliser une substance ayant la même classification en termes de liaison aux ER ainsi qu'une affinité et une classe chimique comparables.
(2) Abréviation: No CAS = Numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service.
(3) Classification comme ligand ou non-ligand des ERα établie à l'issue de l'étude de validation des essais de liaison au hrER du CERI et de FW (2).
(4) L'affinité de liaison aux ER a été établie à partir des Background Review Documents (BRD) de l'ICCVAM relatifs aux essais de liaison aux ER et de TA ER (9) ainsi que des données empiriques et d'autres données tirées des publications parues et examinées (10) (11) (12) (13) (14) (15).
(5) Les substances ont été placées dans une ou plusieurs classes de produits chimiques selon le système de classification du Medical Subject Headings (MeSH) de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis, norme reconnue internationalement (disponible à l'adresse: http://www.nlm.nih.gov/mesh).
(6) Les substances ont été placées dans une ou plusieurs classes de produits selon la base de données Hazardous Substances Database de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis (disponible à l'adresse: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB
(7) Le DBP peut également faire office de témoin non ligand, mais à une concentration maximale de 10–4 M.
(8) La limite de solubilité de cette substance est 10^{-4} M. L'utilisation et la classification du phtalate de dibutyle (DBP) en tant que non-ligand reposent sur un essai à des concentrations allant jusqu'à 10^{-4} M, car au cours des études de prévalidation, certains laboratoires ont observé que la substance était insoluble à 10^{-3} M (p.ex. apparition d'un trouble).

▼M8

Détermination de la solubilité et de l'ordre de grandeur des concentrations des produits chimiques d'essai

19. Un essai préliminaire est nécessaire pour déterminer la limite de solubilité de chaque produit chimique d'essai ainsi que la fourchette de concentrations qui convient pour l'essai. La limite de solubilité de chaque produit chimique d'essai doit d'abord être déterminée dans le solvant, puis confirmée dans les conditions de l'essai. La concentration finale utilisée dans l'essai ne doit pas dépasser 1 mM. L'essai de détermination de l'ordre de grandeur s'effectue à l'aide d'un témoin avec solvant et d'une série logarithmique de huit dilutions de la concentration maximale acceptable (p.ex. 1 mM ou moins, selon la limite de solubilité). On relèvera l'apparition d'un trouble ou d'un précipité, le cas échéant. Il faut ajuster les concentrations des deuxième et troisième expériences de façon à mieux caractériser la courbe concentration-réponse.

Critères d'acceptabilité de l'essai

20. L'acceptation ou le rejet d'un essai dépend de l'évaluation des résultats obtenus avec la substance œstrogénique de référence et les témoins utilisés pour chaque expérience. Il faut d'abord que pour la première plaque, les courbes concentration-réponse complètes obtenues pour les substances de référence de chaque expérience correspondent aux mesures de la performance fondées sur les paramètres d'ajustement des courbes (p.ex. CI50 et pente de Hill) découlant des résultats des méthodes d'essai du CERI et du FW, respectivement (appendices 2 et 3), et des données historiques concernant les témoins dont dispose le laboratoire qui réalise l'essai. Tous les témoins (substance œstrogénique de référence, ligand faible et non-ligand) doivent être classés correctement à l'issue de chaque expérience. Ensuite, les témoins de toutes les plaques suivantes doivent livrer des résultats concordants avec ceux de la première plaque. Il convient d'analyser une fourchette de concentrations du produit chimique d'essai suffisante pour définir clairement le sommet de la courbe de liaison compétitive. La variabilité entre les réplicats de chaque concentration du produit chimique d'essai et entre les trois essais indépendants doit rester raisonnable et défendable sur le plan scientifique. Un laboratoire prouve sa compétence à répéter l' essai de manière homogène en établissant et en entretenant une base de données compilant les résultats historiques pour la substance œstrogénique de référence et les témoins. Les écarts-types (ET) ou coefficients de variation (CV) des moyennes des paramètres d'ajustement des courbes de la substance œstrogénique de référence et du ligand faible témoin obtenues après plusieurs expériences peuvent servir à mesurer la reproductibilité intra-laboratoire. Un avis professionnel s'impose pour analyser les résultats des témoins de la plaque pour chaque essai et pour chaque produit chimique d'essai.

De plus, on respectera les principes suivants eu égard aux critères d'acceptabilité:

— Les données doivent être suffisantes pour évaluer quantitativement la liaison aux ER

— Les concentrations testées doivent rester inférieures à la limite de solubilité du produit chimique d'essai.

Analyse des données

21. La procédure d'analyse définie pour les résultats des essais de liaison à saturation et de liaison compétitive doit être conforme aux principes fondamentaux de caractérisation des interactions ligand-récepteur. Les données de liaison à saturation sont généralement analysées en appliquant un modèle de régression non linéaire fondé sur les liaisons totale et non spécifique. Il peut s'avérer nécessaire d'effectuer une correction du fait de la perte de ligand (p.ex. Swillens, 1995(19)) pour déterminer la capacité maximale de liaison Bmax et la constante de liaison Kd. Dans les essais de liaison compétitive,

▼M8

les données sont typiquement transformées (p.ex. pourcentage de liaison spécifique, logarithme de la concentration de produit chimique d'essai). Les log(CI50) de chaque produit chimique d'essai sont estimés grâce à un logiciel d'ajustement des courbes par régression non linéaire approprié se fondant sur une équation de Hill à quatre paramètres. Après une première analyse, les paramètres d'ajustement des courbes sont déterminés, puis on vérifie visuellement si les données de liaison correspondent à la courbe de liaison compétitive obtenue. Une analyse supplémentaire est parfois nécessaire en vue d'obtenir un ajustement des courbes optimal, par exemple en resserrant le sommet et la base de la courbe ou en appliquant la règle des 10 % (voir appendice 4 et référence 2, Section III.A.2).

22. Le respect des critères d'acceptabilité (paragraphe 20) indique que le système d'essai fonctionne correctement, mais ne garantit pas que chaque essai lancé fournira des données exactes. La réplication des résultats corrects du premier essai constitue la meilleure indication que les valeurs obtenues sont exactes.

Critères généraux d'interprétation des données

23. Il n'existe actuellement aucune méthode d'interprétation des données d'essai de liaison aux ER universellement reconnue. Cependant, les évaluations qualitatives (p.ex. ligand ou non-ligand) et/ou quantitatives (p.ex. CI_{50}, affinité de liaison relative [ALR]) de l'activité médiée par les hrER doivent s'appuyer sur des données empiriques et des raisonnements scientifiques solides.

Rapport d'essai

24. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Essai:

— Essai employé;

Témoins/substance de référence/produit chimique d'essai

— source, numéro de lot, date limite d'utilisation, si disponible

— stabilité du produit chimique d'essai lui-même, si elle est connue;

— solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant, si elles sont connues.

— mesures du pH, de l'osmolalité et du précipité apparu dans le milieu auquel le produit chimique d'essai est ajouté, le cas échéant.

Substance mono-constituant:

— apparence physique, solubilité dans l'eau et autres propriétés physicochimiques pertinentes;

— données d'identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

Substance multi-constituants, UVBC et mélanges:

— caractérisée, autant que possible par p.ex. l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence quantitative et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants.

▼**M8**

Solvant/Véhicule:

— caractérisation (nature, fournisseur et lot);

— justification du choix du solvant/véhicule;

— solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant/véhicule, le cas échéant;

Récepteurs:

— source des récepteurs (fournisseur, numéro de référence, lot, type de récepteur, concentration de récepteurs actifs indiquée par le fournisseur, certification du fournisseur)

— caractérisation des récepteurs (y compris les résultats des essais de liaison à saturation): K_d, B_{max},

— stockage des récepteurs

— ligand radiomarqué:

— fournisseur, numéro de référence, lot, activité spécifique

Conditions de l'essai:

— limites de solubilité dans les conditions de l'essai;

— composition de la solution tamponnée de l'essai de liaison;

— concentration de récepteur;

— concentration de traceur (ligand radiomarqué);

— concentrations de produit chimique d'essai;

— pourcentage de véhicule dans l'essai final;

— température et durée d'incubation;

— méthode de séparation des ligands liés et libres;

— témoins et produits chimiques positifs et négatifs de référence;

— critères d'interprétation des résultats positif, négatif ou équivoque;

Vérification de l'acceptabilité:

— valeurs réelles des CI_{50} et pentes de Hill pour les témoins positifs et produits chimiques de référence inclus dans l'essai de liaison compétitive;

Résultats:

— données brutes, données sur les ligands liés ou libres;

— vérification de la dénaturation, s'il y a lieu;

— concentration minimale avec effet (CME), le cas échéant;

— ALR et/ou CI_{50}, le cas échéant;

— relation concentration-réponse, si possible;

— analyses statistiques, le cas échéant, ainsi qu'une mesure de l'erreur et de la confiance (p.ex. erreur-type de la moyenne, écart-type, CV ou IC 95 %) et description de la façon dont ces données ont été obtenues;

▼**M8**

Discussion des résultats:

— application de la règle des 10 %.

Conclusion

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 34), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(2) OCDE (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(3) OCDE (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(4) OCDE (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: p.20-6.

(6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr*. Relat. Cancer., 16(4): p. 1073-89.

(7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol*. Lab. Med., 135(1): p. 63-6.

(8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo Rev 30(4):293-342.

(9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

(10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol*. *In Vitro*, 22(1): 225-231.

(13) OCDE (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

▼**M8**

(14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. p. 1-188.

(15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Letters, 146: 111-120.

(16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol.* Letters, 180: 213-221.

(17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol*., 196: 58-67.

(18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835-848.

(19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6):1197-1203.

▼**M8**

Appendice 1

DÉFINITIONS ET ABRÉVIATIONS

Règle des 10 %: possibilité d'exclure des points de données des analyses lorsque le pourcentage de liaison spécifique moyen du [^{3}H]-17β-œstradiol pour tous les réplicats d'une concentration dépasse de 10 % ou plus la moyenne correspondant à une concentration inférieure (voir appendice 4).

Critères d'acceptabilité: normes de performance minimales concernant les témoins et étalons de référence de l'essai. Pour qu'un essai soit jugé valide, tous les critères d'acceptabilité doivent être respectés.

Précision (concordance): degré de conformité entre les résultats de l'essais et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de l'essai et l'un des aspects de sa pertinence. Ce terme et celui de «concordance» sont souvent utilisés indifféremment pour qualifier la proportion de résultats corrects d'un essai (1).

CC: Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

CV: coefficient de variation

E2: 17β-estradiol

PE: perturbation endocrinienne

hERα: récepteur des œstrogènes alpha humain

ER: *estrogen receptor* (récepteur des œstrogènes)

Activité œstrogénique: capacité d'un produit chimique à reproduire la capacité du 17β-œstradiol à se fixer aux récepteurs des œstrogènes. La présente méthode d'essai permet de détecter les liaisons au hrERα.

CI_{50}: concentration efficace du produit chimique d'essai induisant la moitié de l'inhibition maximale.

ICCVAM: *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (Comité de coordination inter-agences pour la validation des méthodes alternatives).

Reproductibilité inter-laboratoires: mesure du degré auquel différents laboratoires qualifiés qui emploient le même protocole et testent les mêmes substances peuvent produire des résultats similaires en termes de qualité et de quantité. La reproductibilité inter-laboratoires est déterminée au cours des processus de prévalidation et de validation, et indique dans quelle mesure un essai peut être transféré sans problème entre laboratoires. Elle est parfois désignée par reproductibilité entre laboratoires (1).

Reproductibilité intra-laboratoire: détermination du degré auquel divers membres du personnel qualifié d'un même laboratoire réussissent à obtenir des résultats identiques en ayant recours à un protocole spécifique à des moments différents. Elle est parfois désignée par reproductibilité au sein du laboratoire (1).

▼M8

CME (Concentration minimale avec effet): concentration la plus faible du produit chimique d'essai induisant une réponse (soit la concentration la plus faible du produit chimique d'essai pour laquelle le nombre d'inductions est statistiquement différent de celui du témoin avec véhicule concomitant).

Réplique d'essai: méthode d'essai structurellement et fonctionnellement similaire à une méthode de référence validée et acceptée. Synonyme de méthode d'essai similaire

LDAP: Ligne directrice pour les essais axée sur la performance

Normes de performance: normes, fondées sur une méthode d'essai validée, permettant d'évaluer la comparabilité d'un essai proposé structurellement et fonctionnellement similaire. Elles comprennent: (1) les éléments essentiels de l'essai; (2) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi ceux utilisés pour démontrer les performances acceptables de la méthode d'essai validée; et (3) les niveaux de précision et de fiabilité, comparables à ceux obtenus pour la méthode d'essai validée, que l'essai proposé doit présenter lorsqu'on l'évalue à l'aide des produits chimiques de référence de la liste minimale (1).

Substances d'épreuve de compétence: sous-catégorie des produits chimiques de référence indiqués dans les normes de performance, et qu'un laboratoire peut employer pour démontrer sa compétence technique à mettre en œuvre un essai normalisé. En général, on sélectionne à cet effet des substances qui représentent toute la gamme des réponses, sont disponibles dans le commerce et pour lesquelles on dispose de données de référence de bonne qualité.

Compétence: capacité à conduire correctement un essai, démontrée avant de tester des substances inconnues.

Substance œstrogénique de référence: 17ß-œstradiol (E2, CAS 50-28-2).

Méthodes d'essai de référence: les essais sur lesquels se fonde la ligne directrice 493.

ALR: affinité de liaison relative. L'ALR d'une substance est exprimée en pourcentage à partir du rapport entre le $\log(CI_{50})$ de la substance et le $\log(CI_{50})$ du 17β-œstradiol

Pertinence: description de la relation entre un essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité à des fins spécifiques. Elle définit le degré auquel l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'un essai (1).

Fiabilité: mesure dans laquelle la mise en œuvre d'un essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée par calcul de la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires.

ET: écart-type.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Méthode d'essai validée: essai ayant fait l'objet d'études de validation visant à déterminer sa pertinence (notamment sa précision) et sa fiabilité à des fins spécifiques. Il importe de noter que les performances d'une méthode d'essai validée peuvent être insuffisantes en termes de précision et de fiabilité pour qu'elle soit jugée acceptable pour les besoins envisagés (1).

Validation: processus permettant d'établir la fiabilité et la pertinence d'une approche, d'une méthode, d'un essai ou d'un procédé à des fins particulières (1).

▼**M8**

Appendice 2

PROTOCOLE DE FREYBERGER ET WILSON RELATIF AUX ESSAIS IN VITRO DE LIAISON À SATURATION ET DE LIAISON COMPÉTITIVE AUX RÉCEPTEURS DES ŒSTROGÈNES (ERα) FAISANT APPEL À UN ERα RECOMBINANT INTÉGRAL

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES (VOIR AUSSI INTRODUCTION GÉNÉRALE)

1. Cet essai *in vitro* de liaison à saturation et de liaison compétitive aux récepteurs des œstrogènes (ERα) fait appel au récepteur des œstrogènes alpha humain intégral (hrERα) produit et isolé à partir de cellules d'insectes infectées à l'aide d'un baculovirus. Le protocole mis au point par Freyberger et Wilson a fait l'objet d'une étude de validation internationale réalisée par plusieurs laboratoires (2). Cette étude a démontré la pertinence et la fiabilité de cet essai aux fins prévues.

2. Le présent essai constitue une procédure de criblage visant à détecter les substances qui peuvent se lier au hrERα intégral. Elle permet de déterminer la capacité d'un produit chimique d'essai à former les liaisons avec le hrERα en concurrence avec le 17β-œstradiol. Sur le plan quantitatif, l'essai peut livrer les résultats suivants: la CI50, c'est-à-dire la concentration de produit chimique d'essai nécessaire pour remplacer la moitié du [^{3}H]-17β-œstradiol lié au hrERα, et les affinités de liaison relatives (ALR) vis-à-vis du hrERα des produits chimiques d'essai par rapport au 17β-œstradiol. L'essai visant à trier les produits chimiques, les résultats acceptables sur le plan qualitatif sont la classification des produits chimiques d'essai soit comme ligands, soit comme non-ligands du hrERα, ou comme produits induisant une réponse équivoque, en fonction de critères définis à partir des courbes de liaison.

3. Étant donné que l'essai fait appel à un ligand radiomarqué, le laboratoire doit disposer d'une autorisation de manipuler des matériaux radioactifs. Toutes les procédures qui impliquent des isotopes radioactifs ou des produits chimiques dangereux doivent être conformes aux réglementations et aux procédures établies par la législation nationale.

4. Il convient de lire les parties «**INTRODUCTION GÉNÉRALE**» et «**ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE LIAISON AU hrER**» avant de mettre en œuvre le présent essai à des fins réglementaires. Les définitions et abréviations utilisées dans la présente méthode d'essai sont indiquées à l'appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI (VOIR AUSSI INTRODUCTION GÉNÉRALE

5. L'essai de liaison au hrERα repose principalement sur la mesure de la capacité d'un ligand radiomarqué ([3H]-17β-œstradiol) à se lier aux ER en présence de concentrations croissantes d'un produit chimique d'essai (appelé «compétiteur»). Les produits chimiques d'essai qui présentent une forte affinité de liaison avec les ER entrent en concurrence avec le ligand radiomarqué à une concentration plus faible que les composés ayant une affinité moindre vis-à-vis du récepteur.

6. L'essai comporte deux grands éléments: une expérience de liaison à saturation pour établir les paramètres de l'interaction récepteur-ligand, puis une expérience de liaison compétitive visant à déterminer dans quelle mesure un produit chimique d'essai fait concurrence à un ligand radiomarqué pour se lier aux ER.

7. L'objectif de l'expérience de liaison à saturation est de caractériser le nombre et l'affinité de liaison des récepteurs dans un lot donné, dans la perspective de l'essai de liaison compétitive. L'expérience de liaison à saturation permet de mesurer, à l'équilibre, l'affinité d'une concentration fixe de récepteurs des œstrogènes vis-à-vis de leur ligand naturel (représentée par la constante de dissociation K_d), ainsi que la concentration de sites récepteurs actifs (B_{max}).

▼M8

8. L'expérience de liaison compétitive détermine l'affinité d'une substance à se lier aux ER en concurrence avec le [^{3}H]-17β-œstradiol. Cette affinité est quantifiée par la concentration de produit chimique d'essai qui, à l'équilibre, inhibe 50 % des liaisons spécifiques du [^{3}H]-17β-œstradiol, appelée «concentration induisant 50 % d'inhibition» ou CI_{50}). Elle peut aussi s'exprimer par l'affinité de liaison relative (ALR, calculée par rapport à la CI_{50} de l'œstradiol mesurée séparément lors du même essai). L'expérience de liaison compétitive mesure la liaison aux ER du [^{3}H]-17β-œstradiol en concentration fixe en présence d'une large fourchette (huit ordres de grandeur) de concentrations du produit chimique d'essai. Les données sont ensuite ajustées, quand c'est possible, à une forme de l'équation de Hill (Hill, 1910) décrivant le remplacement du ligand radiomarqué par un compétiteur sur un site unique. L'ampleur du remplacement du ligand radiomarqué œstradiol à l'équilibre permet alors de caractériser le produit chimique d'essai comme ligand, non-ligand ou produit induisant une réponse équivoque.

MODE OPÉRATOIRE

Démonstration de l'acceptabilité de la performance de la protéine hrERα

9. Avant d'effectuer de manière routinière les essais de liaison à saturation et de liaison compétitive, il faut vérifier que chaque nouveau lot de hrERα fonctionne correctement dans le laboratoire où il doit être utilisé. Cette démonstration de la performance repose sur un processus en deux étapes:

— Essai de liaison à saturation avec du [^{3}H]-17β-œstradiol pour démontrer la saturation et la spécificité vis-à-vis du hrERα. Une analyse de régression non linéaire des données obtenues (p.ex. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) permettant d'obtenir une représentation de Scatchard, livrera l'affinité de liaison au hrERα du [^{3}H]-17β-œstradiol (K_d) ainsi que le nombre de récepteurs actifs (B_{max}), pour chaque lot de hrERα.

— Essai de liaison compétitive avec les substances témoins (substance œstrogénique de référence [17β-œstradiol]), un ligand faible (noréthynodrel ou noréthindrone, par exemple) et un non-ligand (octyltriéthoxysilane, OTES). Chaque laboratoire est tenu de créer une base de données historiques visant à documenter que la CI_{50} et d'autres valeurs pertinentes relatives à la substance œstrogénique de référence et au ligand faible restent cohérentes d'une expérience à l'autre et d'un lot de hrERα à l'autre. Il faut que les paramètres des courbes de liaison compétitive obtenus pour les substances témoins demeurent dans les limites de l'intervalle de confiance à 95 % (voir tableau 1) déterminées grâce aux données des laboratoires participant à l'étude de validation de l'essai (2).

Tableau 1

Critères de performance établis pour la substance œstrogénique de référence et le ligand faible dans l'essai de liaison au hrER de FW

Substance	Paramètre	Moyenne [a]	Écart-type (n)	Intervalle de confiance à 95 % [b]	
				Limite minimale	Limite maximale
17β-œstradiol	Sommet (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Base (%)	0,29	1,25 (67)	–0,01	0,60
	Pente de Hill	–1,06	0,20 (67)	–1,11	–1,02
	$LogCI_{50}$ (M)	–8,92 ()	0,18 (67)	–8,97	–8,88

▼**M8**

Substance	Paramètre	Moyenne [a]	Écart-type (n)	Intervalle de confiance à 95 % [b]	
				Limite minimale	Limite maximale
Noréthynodrel	Sommet (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Base (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Pente de Hill	–1,01	0,38 (68)	–1,10	–0,92
	$LogCI_{50}$ (M)	–6,39	0,27 (68)	–6,46	–6,33
Noréthindrone [c]	Sommet (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Base (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Pente de Hill	–1,41	0,32 (27)	–1,53	–1,28
	$LogCI_{50}$ (M)	–5,73	0,27 (27)	–5,84	–5,62

[a] Les valeurs moyennes (n) ± écart-type (ET) ont été calculées à partir d'estimations des paramètres d'ajustement des courbes (équation de Hill à quatre paramètres) issus des essais sur les témoins réalisés par quatre laboratoires dans le cadre de l'étude de validation (voir annexe N de la référence 2)..

[b] Les intervalles de confiance à 95 % sont fournis à titre d'orientation pour les critères d'acceptabilité

[c] L'essai avec la noréthindrone était optionnel pour le volet 4 de l'étude de validation (voir référence 2, Subtask IV). Ainsi, les valeurs moyennes ± ET (n) ont été calculées grâce aux estimations des paramètres d'ajustement des courbes (équation de Hill à quatre paramètres) issus des essais sur les témoins réalisés par deux laboratoires.
La gamme des CI_{50} dépendra de la K_d de la préparation de récepteurs et de la concentration du ligand radiomarqué utilisée par chaque laboratoire. Il est admis d'effectuer les ajustements appropriés pour la fourchette des CI_{50} en fonction des conditions de mise en œuvre de l'essai.

Démonstration des compétences du laboratoire

10. Voir les paragraphes 17 et 18 ainsi que le tableau 2 de la partie «**ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE LIAISON AU hrER**» de la présente méthode d'essai. Chaque essai (liaison à saturation et liaison compétitive) se compose de trois essais indépendants (utilisant de nouvelles dilutions du récepteur, des produits chimiques et des réactifs) réalisés trois jours différents, chacun d'entre eux comportant trois réplicats.

Détermination de la concentration de récepteur (hrERα)

11. La concentration de récepteurs actifs varie légèrement en fonction des lots et des conditions de stockage. C'est pourquoi il convient de déterminer la concentration de récepteurs actifs du lot livré par le fournisseur. Cette étape permet d'obtenir la concentration exacte de récepteurs actifs au moment de l'essai.

12. Dans les mêmes conditions que l'essai de liaison compétitive, donc en présence de [^{3}H]-œstradiol à 1 nM, des concentrations nominales de 0,25; 0,5; 0,75 et 1 nM de récepteur sont incubées en absence (liaison totale) et en présence (liaison non spécifique) d'œstradiol non marqué à 1 µM. La liaison spécifique est calculée en soustrayant la liaison non spécifique de la liaison totale, puis reportée graphiquement en fonction de la concentration nominale de récepteur. La concentration de récepteur pour laquelle la liaison spécifique correspond à 20 % du ligand radiomarqué ajouté permet de déduire la concentration nominale de récepteur. C'est cette dernière qui est utilisée pour les expériences de liaison à saturation et de liaison compétitive. Souvent, cette condition sera remplie par une concentration finale de hrER de 0,5 nM.

▼M8

13. Si le critère des 20 % échoue à plusieurs reprises, il faut chercher d'éventuelles erreurs dans le montage expérimental. L'incapacité à satisfaire le critère des 20 % peut suggérer que le lot de récepteurs recombinants contient très peu de sites actifs; il faut alors envisager d'employer un autre lot.

Essai à saturation

14. Huit concentrations croissantes de [^{3}H]-17β-œstradiol sont évaluées en triple exemplaire en respectant les trois conditions suivantes (voir tableau 2):

— En absence de 17β-œstradiol non marqué et en présence d'ER. Cette condition permet de déterminer la liaison totale en mesurant la radioactivité des puits ne contenant que le [^{3}H]-17β-œstradiol.

— En présence d'une concentration de 17β-œstradiol non marqué mille fois plus importante que celle du 17β-œstradiol radiomarqué et en présence d'ER. Cette condition vise à saturer les sites de liaison actifs avec le 17β-œstradiol non marqué et à déterminer la liaison non spécifique déduite de la radioactivité des puits. En effet, on considère que le reste d'œstradiol chaud (radiomarqué) capable de se lier au récepteur se fixe sur des sites non spécifiques, car l'œstradiol froid (non marqué) doit être en tel excès qu'il occupe tous les sites spécifiques disponibles sur les récepteurs.

— En absence de 17β-œstradiol non marqué et en absence d'ER (détermination de la radioactivité totale)

Préparation des solutions de [^{3}H]-17β-œstradiol et de 17β-œstradiol non marqué

15. Les dilutions de [^{3}H]-17β-œstradiol sont préparées en ajoutant la solution d'essai tamponnée à une solution mère de [^{3}H]-17β-œstradiol à 12 nM afin d'obtenir des concentrations allant d'abord de 0,12 à 12 nM. Les concentrations finales de l'essai, qui vont de 0,03 à 3,0 nM, sont obtenues en ajoutant 40 µl des dilutions précédentes dans chaque puits d'essai d'une plaque microtitre 96 puits, pour un volume final de 160 µl par puits. La préparation de la solution d'essai tamponnée, de la solution mère et des dilutions de [^{3}H]-17β-œstradiol ainsi que la détermination des concentrations sont décrites en détail dans le protocole de FW (2).

16. Les dilutions des solutions éthanoliques de 17β-œstradiol sont préparées par ajout de solution d'essai tamponnée de façon à obtenir huit concentrations croissantes allant d'abord de 0,06 à 6 µM. Les concentrations finales de l'essai, de 0,03 à 3,0 µM, sont obtenues en ajoutant 80 µl des dilutions précédentes dans chaque puits d'essai d'une plaque microtitre 96 puits, pour un volume final de 160 µl par puits. La concentration finale de 17β-œstradiol non marqué dans chaque puits d'essai de liaison non spécifique doit être mille fois supérieure à celle du [^{3}H]-17β-œstradiol. La préparation des dilutions de 17β-œstradiol non marqué est décrite en détail dans le protocole de FW (2).

17. C'est la concentration nominale de récepteur pour laquelle on obtient une liaison spécifique de 20 ± 5 % qui est utilisée pour l'essai (voir paragraphes 12-13). La solution de hrERα doit être préparée immédiatement avant emploi.

18. Les plaques microtitre 96 puits sont préparées conformément au tableau 2, avec 3 réplicats par concentration. L'appendice 2 présente un exemple de plaque indiquant la concentration et la distribution des volumes par puits du [^{3}H]-17β-œstradiol, du 17β-œstradiol non marqué, de la solution tamponnée et du récepteur.

▼M8

Tableau 2

Organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison à saturation

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E2+ ER			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER			Liaison totale (solvant)
B	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,03 µM E2			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,06 µM E2			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,08 µM E2			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,10 µM E2			Liaison non spécifique
E	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,30 µM E2			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,60 µM E2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 1,0 µM E2			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 3,0 µM E2			
F													
G													
H													

[^{3}H] E2: [^{3}H]-17β-œstradio
ER: estrogen receptor (récepteur des œstrogènes)
E2: 17β-œstradiol non marqué

19. Les plaques d'essai microtitre sont placées sur un rotateur et incubées entre 2 et 8 °C pendant 16 à 20 heures.

Mesure du [^{3}H]-17β-œstradiol lié au hrERα

20. Pour séparer le [^{3}H]-17β-œstradiol lié au hrERα du [^{3}H]-17β-œstradiol libre, 80 µl d'une suspension froide de DCC sont d'abord ajoutés dans chaque puits, puis les plaques microtitre sont agitées pendant 10 minutes, et enfin centrifugées pendant 10 minutes à 2 500 tours/min environ. Afin de limiter le plus possible la dissociation du [^{3}H]-17β-œstradiol lié au hrERα pendant ce processus, il est extrêmement important que les solutions tamponnées et les puits d'essai soient maintenus entre 2 et 8 °C et d'enchaîner rapidement les étapes du processus. Un agitateur pour plaques microtitre est nécessaire pour un traitement efficace et rapide.

21. Les 50 µl de surnageant comprenant le [3H]-17β-œstradiol lié au hrERα sont alors prélevés très soigneusement pour éviter de contaminer les puits par contact avec le DCC, puis placés dans une deuxième plaque microtitre.

22. Chaque puits de cette plaque (de A1 à B12 et de D1 à E12) reçoit ensuite 200 µl de scintillateur liquide capable de convertir l'énergie cinétique du rayonnement nucléaire en énergie lumineuse. Les puits G1-H12 (correspondant aux désintégrations par minute - dpm - totales) représentent les dilutions successives du [^{3}H]-17β-œstradiol (40 µl) qui doivent être versées directement dans les puits de la plaque de mesure contenant le scintillateur liquide, comme le montre le tableau 3. Ces puits ne contiennent donc que 200 µl de scintillateur liquide et la dilution appropriée de [^{3}H]-17β-œstradiol. Ils indiquent la quantité de [^{3}H]-17β-œstradiol (exprimée en dpm) ajoutée à chaque série de puits pour la liaison totale et la liaison non spécifique.

▼M8

Tableau 3

Organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison à saturation, mesure de la radioactivité

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E2+ ER			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER			0,10 nM [^{3} H] E2 + ER			Liaison totale (solvant)
B	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [3H] E2 + ER + 0,10 μM E2			Liaison non spécifique
E	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,30 μM E_2			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 1,0 μM E2			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G	0,03 nM [^{3}H] E2 (total en dpm)			0,06 nM [^{3}H] E2			0,08 nM [^{3}H] E2			0,10 nM [^{3}H] E2			Total en dpm (*)
H	0,30 nM [^{3}H] E2			0,60 nM [^{3}H] E2			1,0 nM [^{3}H] E2			3,0 nM [^{3}H] E2			

[^{3}H] E2: [^{3}H]-17β-œstradiol

ER: estrogen receptor (récepteur des œstrogènes)

E2: 17β-œstradiol non marqué

dpm: désintégrations par minute

(*) Les dilutions en série d'œstradiol tritié (chaud) sont ajoutées directement aux 200 μl de scintillateur liquide contenus dans les puits G1 à H12.

23. La mesure de la scintillation commence au moins deux heures après l'ajout, et dure 40 minutes par puits. Les désintégrations par minute par puits (dpm/puits) sont déterminées grâce à un compteur à scintillation pour plaque microtitre, en appliquant une correction de l'extinction. Il est aussi possible, à défaut de compteur à scintillation pour plaque microtitre, d'analyser les échantillons à l'aide d'un compteur classique. Dans ce cas, il est envisageable de raccourcir la durée de mesure.

Essai de liaison compétitive

24. L'essai de liaison compétitive mesure les liaisons du [3H]-17β-œstradiol en concentration fixe en présence de concentrations croissantes de produit chimique d'essai. Il requiert trois réplicats simultanés pour chaque concentration. En outre, trois essais non simultanés sont réalisés pour chaque produit chimique d'essai. L'essai nécessite au moins une plaque microtitre 96 puits

Témoins

25. Le solvant et les témoins concomitants (substance œstrogénique de référence, ligand faible et non-ligand) doivent être inclus dans chaque expérience de l'essai. Pour chaque essai, une même plaque sert à établir les courbes pour toutes les concentrations de la substance œstrogénique de référence et des témoins (ligand faible et non-ligand). Toutes les autres plaques doivent contenir (i) une concentration élevée (remplacement maximal) et une concentration moyenne (correspondant environ à la CI_{50}) d'E2 et du ligand faible, en triple exemplaire; (ii) le témoin avec solvant et des ligands non spécifiques, avec au moins trois réplicats respectivement. Les procédures de préparation de la solution d'essai tamponnée, des solutions du produit chimique d'essai, des témoins, de [^{3}H]-17β-œstradiol et du hrERα sont décrites dans la référence 2 (annexe K, voir le protocole d'essai de FW).

▼**M8**

Témoin avec solvant:

26. Le témoin avec solvant confirme que ce dernier n'interagit pas avec le système d'essai et permet de mesurer la liaison totale (LT). De préférence, on choisira l'éthanol comme solvant. Si la concentration maximale du produit chimique d'essai n'est pas soluble dans l'éthanol, il est aussi possible d'avoir recours au DMSO. À la fin de l'essai, la concentration finale d'éthanol ou de DMSO, le cas échéant, s'élèvera à 1,5 % par puits d'essai, et ne devra pas dépasser 2 %.

Témoin avec solution tamponnée:

27. Le témoin avec solution tamponnée (TST) contient tous les éléments de l'essai sauf le solvant et le produit chimique d'essai. Les résultats du TST sont comparés à ceux obtenus pour le témoin avec solvant afin de vérifier que le solvant utilisé ne perturbe pas le système d'essai.

Ligand fort (substance œstrogénique de référence)

28. Le 17β-œstradiol (CAS 50-28-2) est le ligand endogène qui présente une forte affinité de liaison aux ER de type alpha. Il convient de tracer une courbe de référence pour le 17β-œstradiol non marqué pour chaque essai de liaison compétitive au hrERα, afin d'évaluer la variabilité des essais répétés au fil du temps dans le même laboratoire. Huit solutions de 17β-œstradiol non marqué sont préparées dans l'éthanol, les concentrations d'essai allant de 100 nM à 10 pM (de –7[logM] à –11[logM]), avec les intervalles suivants: –7[logM], –8[logM], –8,5[logM], –9[logM], –9,5[logM], –10[logM] et –11[logM]). La concentration maximale de 17β-œstradiol non marqué (1 μM) sert également d'indicateur de liaison non spécifique (LNS). Cette concentration est donc distinguée par la mention «LNS» dans le tableau 4, même si elle fait également partie de la courbe de référence.

Ligand faible

29. Un ligand faible (noréthynodrel [CAS 68-23-5] ou noréthindrone [CAS 68-22-4]) est inclus pour démontrer la sensibilité de chaque expérience et évaluer la variabilité au fil des répétitions de l'essai. Huit solutions de ligand faible sont préparées dans l'éthanol, avec des concentrations d'essai allant de 3 nM à 30 μM (de –8,5[logM] à –4,5[logM]), avec les intervalles suivants: –4,5[logM], –5[logM], –5,5[logM], –6[logM], –6,5[logM], –7[logM], –7,5[logM] et –8,5[logM].

Non-Ligand

30. On fera appel à l'octyltriéthoxysilane (OTES, CAS 2943-75-1) comme témoin négatif (non-ligand). Ce composé permet de vérifier que tel qu'il est mis en œuvre, l'essai détermine les produits chimiques d'essai qui ne se lient pas au hrERα. Huit solutions de non-ligand sont préparées dans l'éthanol, avec des concentrations d'essai allant de 0,1 nM à 1 000 μM (de –10[logM] à –3[logM]), les intervalles étant définis par incrémentation logarithmique. Il est aussi possible d'utiliser à la place le phtalate de dibutyle (DBP) comme témoin non-ligand. Sa solubilité maximale s'élève à –4[logM].

Concentration de hrERα

31. C'est la quantité de récepteur pour laquelle on obtient une liaison spécifique de 20 ± 5 % du ligand radiomarqué à 1 nM qui est utilisée pour l'essai (voir paragraphes 12-13 de l'appendice 2). La solution de hrERα doit être préparée immédiatement avant emploi.

[^{3}H]-17β-œstradiol

32. La concentration de [^{3}H]-17β-œstradiol dans les puits d'essai doit être 1,0 nM.

▼**M8**

Produits chimiques d'essai

33. Un premier essai s'impose pour déterminer la limite de solubilité de chaque produit chimique d'essai ainsi que la fourchette de concentrations qui convient pour l'essai. La limite de solubilité de chaque produit chimique d'essai doit d'abord être déterminée dans le solvant, puis confirmée dans les conditions de l'essai. La concentration finale utilisée dans l'essai ne doit pas dépasser 1 mM. L'essai de détermination de l'ordre de grandeur s'effectue à l'aide d'un témoin avec solvant et d'une série logarithmique de huit dilutions de la concentration maximale acceptable (p.ex. 1 mM ou moins, selon la limite de solubilité). On relève alors l'apparition d'un trouble ou d'un précipité, le cas échéant (voir aussi le paragraphe 35). Le produit chimique d'essai est analysé grâce aux courbes obtenues pour la série logarithmique de huit concentrations établie par l'essai de détermination de l'ordre de grandeur. Il faut ajuster les concentrations des deuxième et troisième expériences de façon à mieux caractériser la courbe concentration-réponse.

34. Les dilutions du produit chimique d'essai sont préparées dans le solvant approprié (voir paragraphe 26 de l'appendice 2). Si la concentration maximale du produit chimique d'essai n'est soluble ni dans l'éthanol, ni dans le DMSO, et si l'ajout de solvant supplémentaire risque de se traduire par un dépassement de la concentration maximale de solvant acceptable dans le puits en fin d'essai, c'est la concentration immédiatement inférieure qui fait office de concentration maximale. Le cas échéant, il est possible d'ajouter une concentration supplémentaire au début de la série de concentrations, les autres concentrations demeurant inchangées.

35. On observera attentivement les puits au moment d'y verser les solutions de produit chimique d'essai, car cet ajout peut provoquer un précipité. Les données relatives à tous les puits qui contiennent un précipité sont exclues de l'ajustement des courbes, et la raison de cette exclusion est consignée.

36. Si d'autres sources fournissent des données sur le $\log(CI_{50})$ d'un produit chimique d'essai, il peut être judicieux de répartir les dilutions géométriquement autour de cette valeur, par exemple à 0,5 unité logarithmique autour du $\log(CI_{50})$ attendu. Le résultat final doit correspondre à une fourchette de concentrations suffisamment étendue de part et d'autre du $\log(CI_{50})$, comprenant le «sommet» et la «base» de la courbe de liaison afin de pouvoir la caractériser correctement.

Organisation de la plaque d'essai

37. Les plaques microtitre comprennent des séries de six réplicats incubés distingués par des codes correspondant au témoin avec solvant, à la concentration maximale de substance œstrogénique de référence servant aussi d'indicateur de liaison non spécifique (LNS) et au témoin avec solution tamponnée (TST), ainsi que les incubations en triple exemplaire codées de chacune des huit concentrations du témoin non ligand (octyltriéthoxysilane), des sept concentrations inférieures de la substance œstrogénique de référence, des huit concentrations du ligand faible et des huit concentrations de chaque produit chimique d'essai (PCE). Un exemple d'organisation de la plaque d'essai pour obtenir des courbes complètes à partir de toutes les concentrations de la substance œstrogénique de référence et des témoins est fourni ci-dessous dans le tableau 4. D'autres plaques microtitre sont utilisées pour les produits chimiques d'essai, et comprennent aussi 1) une concentration élevée (remplacement maximal) et une concentration moyenne (correspondant environ à la CI_{50}) d'E2 et du ligand faible, en triple exemplaire; 2) les témoins avec solvant et des ligands non spécifiques, chacun en six réplicats

▼M8

(tableau 5). Un exemple d'organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison compétitive de trois produits chimiques d'essai inconnus est disponible dans l'appendice 2.3. Les concentrations indiquées dans les tableaux 4 et 5 sont les concentrations finales de l'essai. La concentration maximale d'E2 doit s'élever à 1×10^{-7} M, tandis que pour le ligand faible, c'est la concentration maximale de la plaque 1 qui est utilisée. Le laboratoire détermine la CI_{50} à partir de sa base de données historiques. Cette valeur doit être similaire à celle issue des études de validation (voir tableau 1).

Tableau 4

Organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison compétitive, courbes concentration-réponse complètes pour la substance œstrogénique de référence et les témoins (plaque 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LT (solvant seul)			LT (solvant seul)			LNS			LNS		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1\times10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1\times10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Blanc (*)		
D	NE ($1\times10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1\times10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1\times10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1\times10^{-7,5}$)			NE ($1\times10^{-8.5}$)		
F	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
G	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Blanc (E2 chaud) (**)			Blanc (E2 chaud) (**)			Témoin avec solution tamponnée			Témoin avec solution tamponnée		

Dans cet exemple, le ligand faible est le noréthynodrel (NE)
(*) Blanc réel, puits non utilisé
(**) Blanc non utilisé pendant l'incubation, mais servant à confirmer la radioactivité totale ajoutée.

Tableau 5

Organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison compétitive, courbes concentration-réponse complètes pour les produits chimiques d'essai et les témoins de la plaque

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LT (solvant seul)			LT (solvant seul)			LNS			LNS		
B	PCE1 (1×10^{-3})			PCE1 (1×10^{-4})			PCE1 (1×10^{-5})			PCE1 (1×10^{-6})		
C	PCE1 (1×10^{-7})			PCE1 (1×10^{-8})			PCE1 (1×10^{-9})			PCE1 (1×10^{-10})		
D	PCE2 (1×10^{-3})			PCE2 (1×10^{-4})			PCE2 (1×10^{-5})			PCE2 (1×10^{-6})		
E	PCE2 (1×10^{-7})			PCE2 (1×10^{-8})			PCE2 (1×10^{-9})			PCE2 (1×10^{-10})		
F	PCE3 (1×10^{-3})			PCE3 (1×10^{-4})			PCE3 (1×10^{-5})			PCE3 (1×10^{-6})		
G	PCE3 (1×10^{-7})			PCE3 (1×10^{-8})			PCE3 (1×10^{-9})			PCE3 (1×10^{-10})		
H	NE (CI_{50})			NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			$E2_{(CI\ 50)}$			E2 (1×10^{-7})		

Dans cet exemple, le ligand faible est le noréthynodrel (NE)

▼M8

Mise en œuvre de l'essai de liaison compétitive

38. Comme le montre le tableau 6, on ajoute dans les puits 80 µl de témoin avec solvant, de témoin avec solution tamponnée, de substance œstrogénique de référence, de ligand faible, de non-ligand et de produit chimique d'essai. Chaque puits reçoit ensuite 40 µl d'une solution de [^{3}H]-17β-œstradiol à 4 nM. Après 10 à 15 minutes de rotation douce à une température située entre 2 et 8 °C, 40 µl d'une solution de hrERα sont ajoutés dans chaque puits. Les plaques d'essai microtitre sont placées sur un rotateur et incubées entre 2 et 8 °C pendant 16 à 20 heures.

Tableau 6

Volume des éléments de l'essai de liaison compétitive au hrER, plaques microtitre

Volume (µl)	Constituant
80	17β-œstradiol non marqué, noréthynodrel, OTES, produits chimiques d'essai, solvant ou solution tamponnée
40	Solution de [^{3}H]-17β-œstradiol à 4 nM
40	Solution de hrERα de concentration déterminée par l'essai préliminaire
160	***Volume total dans chaque puits d'essai***

39. Le [^{3}H]-17β-œstradiol lié au hrERα est séparé du [^{3}H]-17β-œstradiol libre en ajoutant 80 µl d'une suspension froide de DCC dans chaque puits, puis quantifié en suivant la méthode décrite dans les paragraphes 20-23 concernant l'essai de liaison à saturation.

40. Les puits H1 à H6 («blanc (E2 chaud)» dans le tableau 4) fournissent les désintégrations par minute du [^{3}H]-17β-œstradiol dans 40 µl. Les aliquotes de 40 µl sont versées directement dans le scintillateur liquide contenu dans les puits H1 – H6.

Critères d'acceptabilité

Essai de liaison à saturation

41. La courbe de liaison spécifique doit atteindre un plateau pour les concentrations les plus élevées de [^{3}H]-17β-œstradiol, le cas échéant, ce qui traduit la saturation des hrERα avec le ligand.

42. Il faut que la liaison spécifique induite par le [3H]-17β-œstradiol à 1 nM corresponde à une radioactivité égale à 15 à 25 % de la moyenne de la radioactivité totale mesurée dans tous les essais. On peut occasionnellement admettre quelques valeurs en dehors de cette fourchette, mais si les résultats de l'essai la dépassent régulièrement ou si un essai donné livre des résultats très éloignés de cette fourchette, il convient d'ajuster la concentration de protéine et de répéter l'essai de liaison à saturation.

43. Les données doivent aboutir à une représentation de Scatchard linéaire.

44. La liaison non spécifique ne doit pas être excessive: elle est généralement inférieure à 35 % de la liaison totale. Le ratio de ces liaisons pourra néanmoins parfois dépasser ce chiffre s'agissant de mesurer des désintégrations par minutes très faibles pour la concentration d'essai de 17β-œstradiol radiomarqué la plus basse.

▼**M8**

Essai de liaison compétitive

45. Des concentrations croissantes de 17β-œstradiol non marqué doivent déplacer le [^{3}H]-17β-œstradiol des récepteurs selon un modèle de liaison compétitive sur un seul site.

46. Il faut que la CI_{50} de la substance œstrogénique de référence (17β-œstradiol) soit *grosso modo* égale à la concentration molaire de [^{3}H]-17β-œstradiol plus la K_d établie par l'essai de liaison à saturation.

47. La liaison spécifique totale doit rester cohérente et s'élever à 20 ± 5 % lorsque la concentration moyenne de la radioactivité totale ajoutée à chaque puits vaut 1 nM pour tous les essais. On peut occasionnellement admettre quelques valeurs en dehors de cette fourchette, mais si les résultats de l'essai la dépassent régulièrement ou si un essai donné livre des résultats très éloignés de cette fourchette, il convient d'ajuster la concentration de protéine et de répéter l'essai de liaison à saturation.

48. Le solvant ne doit pas modifier la sensibilité ou la reproductibilité de l'essai. Les résultats du témoin avec solvant (puits TS) sont comparés à ceux obtenus pour le témoin avec solution tamponnée (TST) afin de vérifier que le solvant utilisé ne perturbe pas le système d'essai. Quand le solvant n'a aucun effet sur l'essai, les résultats correspondant au TS et au TST sont comparables.

49. Le non-ligand ne doit pas remplacer plus de 25 % du [^{3}H]-17β-œstradiol lié au hrERα à des concentrations allant jusqu'à 10^{-3} M (OTES) ou 10^{-4} M (DBP).

50. Des critères de performance ont été définis pour la substance œstrogénique de référence et pour les deux ligands faibles (p.ex. noréthynodrel et noréthindrone) à partir des données de l'étude de validation de l'essai de liaison au hrER de FW (annexe N de la référence 2). Les intervalles de confiance à 95 % découlent des valeurs moyennes (n) +/- ET calculées grâce à l'ensemble des essais témoins effectués par les laboratoires participant à l'étude de validation. Les intervalles de confiance à 95 % ont été calculés pour les paramètres d'ajustement des courbes (p.ex. sommet, base, pente de Hill et $logCI_{50}$) correspondant à la substance œstrogénique de référence et aux ligands faibles ainsi que pour le log_{10}ALR des ligands faibles par rapport à la substance œstrogénique de référence. Ces intervalles sont fournis à titre de critères de performance des témoins positifs. Le tableau 1 présente les fourchettes attendues pour les paramètres d'ajustement des courbes pouvant faire office de critères de performance. En pratique, la fourchette de la CI_{50} peut varier légèrement en fonction de la K_d de la préparation de récepteurs et de la concentration du ligand.

51. Aucun critère de performance n'a été établi pour les paramètres d'ajustement des courbes correspondant aux produits chimiques d'essai du fait de la grande diversité des composés potentiellement testés ainsi que des affinités et résultats correspondants (p.ex. ajustement complet, partiel ou nul des courbes). On fera toutefois appel à un avis professionnel pour analyser les résultats de chaque essai sur un produit chimique. Il convient d'avoir recours à une fourchette de concentrations d'essai suffisante pour définir clairement le sommet de la courbe de liaison compétitive (p.ex. pour induire 90 à 100 % de liaison). La variabilité entre les réplicats de chaque concentration du produit chimique d'essai et entre les trois essais non simultanés doit rester raisonnable et défendable sur le plan scientifique. Il est nécessaire que les témoins utilisés pour chaque essai sur un produit chimique d'essai soient proches des mesures de la performance documentées pour cette méthode de FW, et en harmonie avec les données historiques obtenues pour les témoins par chaque laboratoire.

▼M8

ANALYSE DES DONNÉES

Essai de liaison à saturation

52. Cet essai mesure la liaison totale et la liaison non spécifique. Ces valeurs permettent de calculer la liaison spécifique induite par des concentrations croissantes de [^{3}H]-17β-œstradiol à l'équilibre, en soustrayant la liaison non spécifique de la liaison totale. La courbe reportant la liaison spécifique en fonction de la concentration de [^{3}H]-17β-œstradiol doit atteindre un plateau pour la liaison spécifique maximale, qui indique la saturation des hrERα par le [^{3}H]-17β-œstradiol. De plus, l'analyse des données documente la liaison du [^{3}H]-17β- œstradiol à un site de liaison unique à haute affinité. Il faut que la courbe de liaison à saturation indique les liaisons non spécifique, totale et spécifique. Une régression non linéaire (p.ex. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) permet d'approfondir l'analyse des données, et les résultats sont finalement présentés sous forme d'une représentation de Scatchard.

53. L'analyse des données doit déterminer la B_{max} et la K_d en se fondant uniquement sur les données de liaison totale, étant supposé que la liaison non spécifique est linéaire, à moins de justifier le recours à une autre méthode. Par ailleurs, on détermine le meilleur ajustement des courbes à l'aide d'une analyse de régression solide, une justification étant nécessaire dans le cas contraire. La méthode choisie pour cette analyse de régression solide sera indiquée. Une correction relative à la perte de ligand (p.ex. avec la méthode de Swillens, 1995) sera toujours appliquée pour déterminer la B_{max} et la K_d à partir des données de liaison à saturation.

Essai de liaison compétitive

54. La courbe de liaison compétitive présente la liaison spécifique du [^{3}H]-17β-œstradiol en fonction de la concentration (en $\log_{10}$) du compétiteur. La concentration de produit chimique d'essai qui inhibe 50 % de la liaison spécifique maximale du [^{3}H]-17β-œstradiol correspond à la CI_{50}.

55. Des estimations des $\log(CI_{50})$ des témoins positifs (p.ex. substance œstrogénique de référence et ligand faible) sont obtenues grâce à un logiciel approprié d'ajustement de courbe par méthode non linéaire d'après une équation de Hill à quatre paramètres (p.ex. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Ces ajustements se font sans imposer de limites au sommet, à la base, à la pente et au $\log(CI_{50})$ des courbes. Le meilleur ajustement des courbes est établi grâce à une analyse de régression solide, une justification étant nécessaire dans le cas contraire. Aucune correction n'est effectuée pour la perte de ligand. Après l'analyse initiale, chaque courbe de liaison est examinée pour vérifier qu'elle est bien ajustée au modèle. L'affinité de liaison relative (ALR) du ligand faible est exprimée en pourcentage à partir du rapport entre le $\log(CI_{50})$ du ligand faible et le $\log(CI_{50})$ du 17β-œstradiol. Les résultats des témoins positifs et du témoin non ligand sont évalués à partir des mesures de la performance de l'essai indiquées dans les paragraphes 45-50 de l'appendice 2.

56. Les données obtenues pour tous les produits chimiques d'essai doivent être analysées par étape pour veiller à l'évaluation appropriée des résultats et à la classification correcte de chaque courbe de liaison compétitive. Ainsi, pour chaque essai sur un produit chimique, il est d'abord recommandé d'effectuer une analyse des données normalisée identique à celle utilisée pour la substance œstrogénique de référence et les témoins avec ligand de faible affinité (voir paragraphe 55 précédent). Cette étape est suivie d'un examen technique de l'ajustement des paramètres de la courbe et d'un examen visuel pour déterminer dans quelle mesure les données correspondent à la courbe de liaison compétitive obtenue pour chaque essai. Cet examen technique repose sur trois observations indiquant que l'essai et les analyses ont été réalisés correctement: une baisse du pourcentage de [^{3}H]-17β-œstradiol lié aux sites spécifiques en fonction de la concentration, une faible variabilité entre les réplicats techniques de chaque concentration de produit chimique d'essai et la cohérence des paramètres d'ajustement entre les trois essais.

▼M8

Interprétation des données

57. Sous réserve du respect de l'ensemble des critères d'acceptabilité, un produit chimique d'essai est considéré comme ligand du hrERα si sa courbe de liaison peut être ajustée et si le point le plus bas de la courbe de réponse obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison inférieure à 50 % (graphique 1).

58. Sous réserve du respect de l'ensemble des critères d'acceptabilité, un produit chimique d'essai est considéré comme non-ligand du hrERα si:

— sa courbe de liaison peut être ajustée et si le point le plus bas de la courbe de réponse ajustée obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison supérieure à 75 %, ou

— sa courbe de liaison ne peut pas être ajustée et si la moyenne des pourcentages de liaison non lissés de tous les groupes de concentration de l'essai est supérieure à 75 %.

59. Les produits chimiques d'essai sont considérés comme équivoques si aucune des conditions qui précèdent n'est satisfaite (p.ex. le point le plus bas de la courbe de réponse ajustée correspond à une liaison située entre 76 et 51 %).

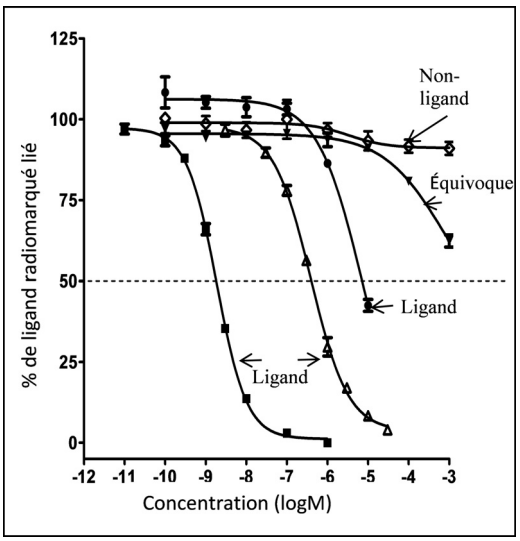
Tableau 7

Critères de classification d'un produit chimique d'essai fondée sur sa courbe de liaison compétitive

Classification	Critères
Ligand[a]	Le **point le plus bas de la courbe de réponse obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison inférieure à 50 %.**
Non-ligand[b]	S'il est possible d'ajuster la courbe, le **point le plus bas de la courbe de réponse ajustée obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison supérieure à 75 %.** S'il n'est pas possible d'ajuster la courbe, la **moyenne des pourcentages de liaison non lissés de tous les groupes de concentration de l'essai est supérieure à 75 %.**
Équivoque[c]	(P.ex. le point le plus bas de la courbe de réponse ajustée correspond à une liaison située entre 76 et 51 %.)

Graphique 1

Exemples de classification d'un produit chimique d'essai grâce à la courbe de liaison compétitive



▼**M8**

60. Les différents essais réalisés par un laboratoire sur un produit chimique d'essai sont combinés en attribuant des valeurs numériques à chaque essai et en calculant la moyenne de ces valeurs, comme l'indique le tableau 8. Les résultats combinés des essais de chaque laboratoire sont alors comparés à la classification attendue pour chaque produit chimique d'essai.

Table 8

Method for classification of test chemical using multiple runs within a laboratory

Attribution d'une valeur à chaque essai:	
Classification	**Valeur numérique**
Ligand	2
Équivoque	1
Non-ligand	0
Classification selon la moyenne des valeurs numériques de toutes les expériences:	
Classification	**Valeur numérique**
Ligand	Moyenne ≥ 1,5
Équivoque	0,5 ≤ Moyenne < 1,5
Non-ligand	Moyenne < 0,5

RAPPORT D'ESSAI

61. Voir le paragraphe 24 de la partie «**ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE LIAISON AU hrER**» de la présente méthode d'essai.

▼**M8**

Appendice 2.1

LISTE DE TERMES

[^{3}H]E2: 17β-œstradiol radiomarqué au tritium

DCC: *dextran-coated charcoal* (charbon enrobé de dextrane)

E2: 17β-œstradiol non marqué (inerte)

Solution d'essai tamponnée: solution composée de 10 mM de tris, 10 mg/ml d'albumine sérique bovine, 2 mM de DTT, 10 % de glycérol et 0,2 mM de leupeptine, à pH 7,5

hrERα: récepteur des œstrogènes alpha recombinant humain

Réplicat: un des multiples puits qui contiennent les mêmes éléments aux mêmes concentrations et sont testés simultanément dans un même essai. Le présent protocole prévoit que chaque concentration du produit chimique d'essai soit soumise à l'essai en triple exemplaire, c'est-à-dire que trois réplicats de chacune d'elle sont testés simultanément.

Essai: série complète d'expériences simultanées dans les puits d'une plaque microtitre livrant l'ensemble des données nécessaires pour caractériser l'affinité de liaison au hrERα d'un produit chimique d'essai, soit la quantité totale de [^{3}H]-17β-œstradiol ajoutée dans un puits, la liaison maximale au hrERα du [^{3}H]-17β-œstradiol, la liaison non spécifique et la liaison totale pour diverses concentrations du produit chimique d'essai. Un essai peut reposer sur un seul puits d'essai (réplicat) par concentration, mais dans la mesure où le présent protocole exige des expériences en triple exemplaire, un essai requiert ici trois puits d'essai par concentration. De plus, le présent protocole impose de réaliser trois essais indépendants (non simultanés) par produit chimique.

▼**M8**

Appendice 2.2

ESSAI CLASSIQUE DE SATURATION PAR LE [^{3}H]-17B-ŒSTRADIOL EN TRIPLE EXEMPLAIRE

Essai classique de saturation par le [^{3}H]-17β-œstradiol en triple exemplaire

Position	Réplicat	Code par type de puits	Concentration initiale d'E2 chaud (nM)	Volume d'E2 chaud (µl)	Concentration finale d'E2 chaud (nM)	Concentration initiale d'E2 froid (µM)	Volume d'E2 froid (µl)	Concentration finale d'E2 froid (µM)	Volume de solution tamponnée (µl)	Volume de récepteur (µl)	Volume total dans les puits
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

▼M8

Essai classique de saturation par le [^{3}H]-17β-œstradiol en triple exemplaire											
Position	**Réplicat**	**Code par type de puits**	**Concentration initiale d'E2 chaud (nM)**	**Volume d'E2 chaud (µl)**	**Concentration finale d'E2 chaud (nM)**	**Concentration initiale d'E2 froid (µM)**	**Volume d'E2 froid (µl)**	**Concentration finale d'E2 froid (µM)**	**Volume de solution tamponnée (µl)**	**Volume de récepteur (µl)**	**Volume total dans les puits**
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

▼**M8**

Essai classique de saturation par le [^{3}H]-17β-œstradiol en triple exemplaire											
Position	**Réplicat**	**Code par type de puits**	**Concentration initiale d'E2 chaud (nM)**	**Volume d'E2 chaud (µl)**	**Concentration finale d'E2 chaud (nM)**	**Concentration initiale d'E2 froid (µM)**	**Volume d'E2 froid (µl)**	**Concentration finale d'E2 froid (µM)**	**Volume de solution tamponnée (µl)**	**Volume de récepteur (µl)**	**Volume total dans les puits**
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Chaud	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Chaud	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Chaud	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Chaud	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Chaud	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Chaud	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Chaud	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Chaud	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Chaud	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Chaud	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Chaud	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Chaud	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40

▼**M8**

Essai classique de saturation par le [^{3}H]-17β-œstradiol en triple exemplaire

Position	Réplicat	Code par type de puits	Concentration initiale d'E2 chaud (nM)	Volume d'E2 chaud (µl)	Concentration finale d'E2 chaud (nM)	Concentration initiale d'E2 froid (µM)	Volume d'E2 froid (µl)	Concentration finale d'E2 froid (µM)	Volume de solution tamponnée (µl)	Volume de récepteur (µl)	Volume total dans les puits
H1	1	Chaud	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Chaud	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Chaud	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Chaud	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	Chaud	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Chaud	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Chaud	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Chaud	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Chaud	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Chaud	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Chaud	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Chaud	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Veuillez noter que les puits codés «chaud» sont vides pendant l'incubation. Les 40 µl qui y sont ensuite ajoutés ne servent qu'au comptage par scintillation.

▼**M8**

Appendice 2.3

ORGANISATION DES PUITS POUR L'ESSAI DE LIAISON COMPÉTITIVE

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur(M)	Volume de solution mère de hrER (µl)	Volume de solution tamponnée(µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque de dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur(M)
S	A1	1	liaison totale	LT	LT1	—	40		40	80	160	—
S	A2	2	liaison totale	LT	LT2	—	40		40	80	160	—
S	A3	3	liaison totale	LT	LT3	—	40		40	80	160	—
S	A4	1	liaison totale	LT	LT4	—	40		40	80	160	—
S	A5	2	liaison totale	LT	LT5	—	40		40	80	160	—
S	A6	3	liaison totale	TB	LT6	—	40		40	80	160	—
S	A7	1	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	A8	2	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	A9	3	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	A10	1	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	A11	2	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	A12	3	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	B1	1	E2 froid	S	S1	2.00E-07	40	—	40	80	160	1.0E-07
S	B2	2	E2 froid	S	S1	2.00E-07	40	—	40	80	160	1.0E-07
S	B3	3	E2 froid	S	S1	2.00E-07	40	—	40	80	160	1.0E-07
S	B4	1	E2 froid	S	S2	2.00E-08	40	—	40	80	160	1.0E-08

▼**M8**

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur(M)	Volume de solution mère de hrER (µl)	Volume de solution tamponnée(µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque de dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur(M)
S	B5	2	E2 froid	S	S2	2.00E-08	40	—	40	80	160	1.0E-08
S	B6	3	E2 froid	S	S2	2.00E-08	40	—	40	80	160	1.0E-08
S	B7	1	E2 froid	S	S3	6.00E-09	40	—	40	80	160	3.0E-09
S	B8	2	E2 froid	S	S3	6.00E-09	40	—	40	80	160	3.0E-09
S	B9	3	E2 froid	S	S3	6.00E-09	40	—	40	80	160	3.0E-09
S	B10	1	E2 froid	S	S4	2.00E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09
S	B11	2	E2 froid	S	S4	2.00E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09
S	B12	3	E2 froid	S	S4	2.00E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09
S	C1	1	E2 froid	S	S5	6.00E-10	40	—	40	80	160	3.0E-10
S	C2	2	E2 froid	S	S5	6.00E-10	40	—	40	80	160	3.0E-10
S	C3	3	E2 froid	S	S5	6.00E-10	40	—	40	80	160	3.0E-10
S	C4	1	E2 froid	S	S6	2.00E-10	40	—	40	80	160	1.0E-10
S	C5	2	E2 froid	S	S6	2.00E-10	40	—	40	80	160	1.0E-10
S	C6	3	E2 froid	S	S6	2.00E-10	40	—	40	80	160	1.0E-10
S	C7	1	E2 froid	S	S7	2.00E-11	40	—	40	80	160	1.0E-11
S	C8	2	E2 froid	S	S7	2.00E-11	40	—	40	80	160	1.0E-11

▼**M8**

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur(M)	Volume de solution mère de hrER (µl)	Volume de solution tamponnée(µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque de dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur(M)
S	C9	3	E2 froid	S	S7	2.00E-11	40	—	40	80	160	1.0E-11
S	C10	1	blanc	blanc	B1	—	—	160	—	—	160	—
S	C11	2	blanc	blanc	B2	—	—	160	—	—	160	—
S	C12	3	blanc	blanc	B3	—	—	160	—	—	160	—
S	D1	1	noréthyno-drel	NE	LF1	6.00E-05	40	—	40	80	160	3.0E-05
S	D2	1	noréthyno-drel	NE	LF1	6.00E-05	40	—	40	80	160	3.0E-05
S	D3	1	noréthyno-drel	NE	LF1	6.00E-05	40	—	40	80	160	3.0E-05
S	D4	1	noréthyno-drel	NE	LF2	2.00E-05	40	—	40	80	160	1.0E-05
S	D5	1	noréthyno-drel	NE	LF2	2.00E-05	40	—	40	80	160	1.0E-05
S	D6	1	noréthyno-drel	NE	LF2	2.00E-05	40	—	40	80	160	1.0E-05
S	D7	1	noréthyno-drel	NE	LF3	6.00E-06	40	—	40	80	160	3.0E-06
S	D8	1	noréthyno-drel	NE	LF3	6.00E-06	40	—	40	80	160	3.0E-06
S	D9	1	noréthyno-drel	NE	LF3	6.00E-06	40	—	40	80	160	3.0E-06
S	D10	1	noréthyno-drel	NE	LF4	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	D11	1	noréthyno-drel	NE	LF4	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	D12	1	noréthyno-drel	NE	LF4	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	E1	1	noréthyno-drel	NE	LF	6.00E-07	40		40	80	160	3.0E-07
S	E2	2	noréthyno-drel	NE	LF	6.00E-07	40		40	80	160	3.0E-07
S	E3	3	noréthyno-drel	NE	LF	6.00E-07	40		40	80	160	3.0E-07
S	E4	1	noréthyno-drel	NE	LF	2.00E-07	40		40	80	160	1.0E-07
S	E5	2	noréthyno-drel	NE	LF	2.00E-07	40		40	80	160	1.0E-07
S	E6	3	noréthyno-drel	NE	LF	2.00E-07	40		40	80	160	1.0E-07
S	E7	1	noréthyno-drel	NE	LF	6.00E-08	40	—	40	80	160	3.0E-08

▼**M8**

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur(M)	Volume de solution mère de hrER (µl)	Volume de solution tamponnée(µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque de dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur(M)
S	E8	2	noréthyno-drel	NE	LF	6.00E-08	40	—	40	80	160	3.0E-08
S	E9	3	noréthyno-drel	NE	LF	6.00E-08	40	—	40	80	160	3.0E-08
S	E10	1	noréthyno-drel	NE	LF	6.00E-09	40	—	40	80	160	3.0E-09
S	E11	2	noréthyno-drel	NE	LF	6.00E-09	40	—	40	80	160	3.0E-09
S	E12	3	noréthyno-drel	NE	LF	6.00E-09	40	—	40	80	160	3.0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2.00E-03	40	—	40	80	160	1.0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2.00E-03	40	—	40	80	160	1.0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2.00E-03	40	—	40	80	160	1.0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2.00E-04	40	—	40	80	160	1.0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2.00E-04	40	—	40	80	160	1.0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2.00E-04	40	—	40	80	160	1.0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2.00E-05	40	—	40	80	160	3.0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2.00E-05	40	—	40	80	160	3.0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2.00E-05	40	—	40	80	160	3.0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2.00E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2.00E-07	40	—	40	80	160	3.0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2.00E-07	40	—	40	80	160	3.0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2.00E-07	40	—	40	80	160	3.0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2.00E-08	40	—	40	80	160	1.0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2.00E-08	40	—	40	80	160	1.0E-08

▼**M8**

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur(M)	Volume de solution mère de hrER (µl)	Volume de solution tamponnée(µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque de dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur(M)
S	G6	3	OTES	N	OTES	2.00E-08	40	—	40	80	160	1.0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2.00E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09
S	G8	2	OTES	N	OTES	2.00E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2.00E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2.00E-10	40	—	40	—	160	1.0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2.00E-10	40	—	40	—	160	1.0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2.00E-10	40	—	40	—	160	1.0E-10
S	H1	1	chaud	C	C	—	—	—	40	—	40	—
S	H2	1	chaud	C	C	—	—	—	40	—	40	—
S	H3	1	chaud	C	C	—	—	—	40	—	40	—
S	H4	1	chaud	C	C	—	—	—	40	—	40	—
S	H5	1	chaud	C	C	—	—	—	40	—	40	—
S	H6	1	chaud	C	C	—	—	—	40	—	40	—
S	H7	1	Tampon	TST	TST	—	40	80	40	—	160	—
S	H8	1	Tampon	TST	TST	—	40	80	40	—	160	—
S	H9	1	Tampon	TST	TST	—	40	80	40	—	160	—
S	H10	1	Tampon	TST	TST	—	40	80	40	—	160	—
S	H11	1	Tampon	TST	TST	—	40	80	40	—	160	—
S	H12	1	Tampon	TST	TST	—	40	80	40	—	160	—

Veuillez noter que les puits codés «chaud» sont vides pendant l'incubation. Les 40 µl qui y sont ensuite ajoutés ne servent qu'au comptage par scintillation.

▼M8

Organisation des puits pour l'essai de liaison compétitive

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur(M)	Volume de la solution mère de hrER (µl)	Volume de la solution tamponnée(µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur (M)
P1	A1	1	liaison totale	LT	LT1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	liaison totale	LT	LT2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	liaison totale	LT	LT3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	liaison totale	LT	LT4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	liaison totale	LT	LT5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	liaison totale	LT	LT6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E–06	40	—	40	80	160	1.0E–06
P1	A8	2	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E–06	40	—	40	80	160	1.0E–06
P1	A9	3	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E–06	40	—	40	80	160	1.0E–06
P1	A10	1	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E–06	40	—	40	80	160	1.0E–06
P1	A11	2	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E–06	40	—	40	80	160	1.0E–06
P1	A12	3	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E–06	40	—	40	80	160	1.0E–06
P1	B1	1	Prod. chim. d'essai PCE1 1		1	2.00E–03	40	0	40	80	160	1.0E–03
P1	B2	2	Prod. chim. d'essai PCE1 1		1	2.00E–03	40	0	40	80	160	1.0E–03
P1	B3	3	Prod. chim. d'essai PCE1 1		1	2.00E–03	40	0	40	80	160	1.0E–03
P1	B4	1	Prod. chim. d'essai PCE1 1		2	2.00E–04	40	0	40	80	160	1.0E–04
P1	B5	2	Prod. chim. d'essai PCE1 1		2	2.00E–04	40	0	40	80	160	1.0E–04
P1	B6	3	Prod. chim. d'essai PCE1 1		2	2.00E–04	40	0	40	80	160	1.0E–04
P1	B7	1	Prod. chim. d'essai PCE1 1		3	2.00E–05	40	0	40	80	160	1.0E–05
P1	B8	2	Prod. chim. d'essai PCE1 1		3	2.00E–05	40	0	40	80	160	1.0E–05
P1	B9	3	Prod. chim. d'essai PCE1 1		3	2.00E–05	40	0	40	80	160	1.0E–05
P1	B10	1	Prod. chim. d'essai PCE1 1		4	2.00E–06	40	0	40	80	160	1.0E–06
P1	B11	2	Prod. chim. d'essai PCE1 1		4	2.00E–06	40	0	40	80	160	1.0E–06
P1	B12	3	Prod. chim. d'essai PCE1 1		4	2.00E–06	40	0	40	80	160	1.0E–06

▼M8

Organisation des puits pour l'essai de liaison compétitive

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur(M)	Volume de la solution mère de hrER (µl)	Volume de la solution tamponnée(µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur (M)
P1	C1	1	Prod. chim. d'essai	PCE1 1	5	2.00E–07	40	0	40	80	160	1.0E–07
P1	C2	2	Prod. chim. testé 1	PCT1	5	2.00E–07	40	0	40	80	160	1.0E–07
P1	C3	3	Prod. chim. d'essai	PCE1 1	5	2.00E–07	40	0	40	80	160	1.0E–07
P1	C4	1	Prod. chim. d'essai 1	PCE1	6	2.00E–08	40	0	40	80	160	1.0E–08
P1	C5	2	Prod. chim. d'essai	PCE1 1	6	2.00E–08	40	0	40	80	160	1.0E–08
P1	C6	3	Prod. chim. d'essai	PCE1 1	6	2.00E–08	40	0	40	80	160	1.0E–08
P1	C7	1	Prod. chim. d'essai	PCE1 1	7	2.00E–09	40	0	40	80	160	1.0E–09
P1	C8	2	Prod. chim. d'essai	PCE1 1	7	2.00E–09	40	0	40	80	160	1.0E–09
P1	C9	3	Prod. chim. d'essai	PCE1 1	7	2.00E–09	40	0	40	80	160	1.0E–09
P1	C10	1	Prod. chim. d'essai	PCE1 1	8	2.00E–10	40	0	40	80	160	1.0E–10
P1	C11	2	Prod. chim. d'essai	PCE1 1	8	2.00E–10	40	0	40	80	160	1.0E–10
P1	C12	3	Prod. chim. d'essai	PCE1 1	8	2.00E–10	40	0	40	80	160	1.0E–10
P1	D1	1	Prod. chim. d'essai	PCE2 2	1	2.00E–03	40	0	40	80	160	1.0E–03
P1	D2	2	Prod. chim. d'essai	PCE2 2	1	2.00E–03	40	0	40	80	160	1.0E–03
P1	D3	3	Prod. chim. d'essai	PCE2 2	1	2.00E–03	40	0	40	80	160	1.0E–03
P1	D4	1	Prod. chim. d'essai	PCE2 2	2	2.00E–04	40	0	40	80	160	1.0E–04
P1	D5	2	Prod. chim. d'essai	PCE2 2	2	2.00E–04	40	0	40	80	160	1.0E–04
P1	D6	3	Prod. chim. d'essai	PCE2 2	2	2.00E–04	40	0	40	80	160	1.0E–04
P1	D7	1	Prod. chim. d'essai	PCE2 2	3	2.00E–05	40	0	40	80	160	1.0E–05
P1	D8	2	Prod. chim. d'essai	PCE2 2	3	2.00E–05	40	0	40	80	160	1.0E–05
P1	D9	3	Prod. chim. d'essai	PCE2 2	3	2.00E–05	40	0	40	80	160	1.0E–05
P1	D10	1	Prod. chim. d'essai	PCE2 2	4	2.00E–06	40	0	40	80	160	1.0E–06
P1	D11	2	Prod. chim. d'essai	PCE2 2	4	2.00E–06	40	0	40	80	160	1.0E–06
P1	D12	3	Prod.chim. d'essai	PCE2 2	4	2.00E–06	40	0	40	80	160	1.0E–06

▼M8

Organisation des puits pour l'essai de liaison compétitive												
Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur(M)	Volume de la solution mère de hrER (µl)	Volume de la solution tamponnée(µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur (M)
P1	E1	1	Prod. chim. d'essai	PCE2 2	5	2.00E–07	40	0	40	80	160	1.0E–07
P1	E2	2	Prod. chim. d'essai	PCE2 2	5	2.00E–07	40	0	40	80	160	1.0E–07
P1	E3	3	Prod. chim. d'essai	PCE2 2	5	2.00E–07	40	0	40	80	160	1.0E–07
P1	E4	1	Prod. chim. d'essai	PCE2 2	6	—	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E5	2	Prod. chim. d'essai	PCE2 2	6	—	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E6	3	Prod. chim. d'essai	PCE2 2	6	—	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E7	1	Prod. chim. d'essai	PCE2 2	7	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E8	2	Prod. chim. d'essai	PCE2 2	7	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E9	3	Prod. chim. d'essai	PCE2 2	7	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E10	1	Prod. chim. d'essai	PCE2 2	8	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	E11	2	Prod. chim. d'essai	PCE2 2	8	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	E12	3	Prod. chim. d'essai	PCE2 2	8	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	F1	1	Prod. chim. d'essai	PCE3 3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F2	2	Prod. chim. d'essai	PCE3 3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F3	3	Prod. chim. d'essai	PCE3 3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F4	1	Prod. chim. d'essai	PCE3 3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F5	2	Prod. chim. d'essai	PCE3 3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F6	3	Prod. chim. d'essai	PCE3 3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F7	1	Prod. chim. d'essai	PCE3 3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F8	2	Prod. chim. d'essai	PCE3 3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F9	3	Prod. chim. d'essai	PCE3 3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F10	1	Prod. chim. d'essai	PCE3 3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	F11	2	Prod. chim. d'essai	PCE3 3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	F12	3	Prod. chim. d'essai	PCE3 3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06

▼**M8**

Organisation des puits pour l'essai de liaison compétitive

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur(M)	Volume de la solution mère de hrER (µl)	Volume de la solution tamponnée(µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur (M)
P1	G1	1	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G2	2	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G3	3	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G4	1	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G5	2	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G6	3	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G7	1	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G8	2	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G9	3	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G10	1	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	G11	2	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	G12	3	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	H1	1	noréthynodrel	NE		CI50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noréthynodrel	NE		CI50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noréthynodrel	NE		CI50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noréthynodrel	NE		1.00E-4.5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noréthynodrel	NE		1.00E-4.5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noréthynodrel	NE		1.00E-4.5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	E2 froid	S		CI50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	E2 froid	S		CI50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	E2 froid	S		CI50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	E2 froid	S		1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	E2 froid	S		1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	E2 froid	S		1,00E-7	40	0	40	80	160	

▼**M8**

Appendice 3

PROTOCOLE DE L'ESSAI IN VITRO DE LIAISON AU RÉCEPTE UR DES ŒSTROGÈNES (ER) FONDÉ SUR LA PROTÉINE DU DOMAINE DE LIAISON DU LIGAND DE L'ERA RECOMBINANT HUMAIN CONFORMÉMENT À LA MÉTHODE DU CERI

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES (VOIR AUSSI INTRODUCTION GÉNÉRALE)

1. Cet essai *in vitro* de liaison à saturation et de liaison compétitive au récepteur des œstrogènes (ERα) fait appel au domaine de liaison du ligand (DLL) du récepteur des œstrogènes α humain (hrERα). Cette protéine chimère a été produite par le Chemicals Evaluation Research Institute (CERI, Japon), et existe sous forme de protéine de fusion glutathion-S-transférase (GST), exprimée par *E. coli*. Le protocole mis au point par le CERI a fait l'objet d'une étude de validation internationale réalisée par plusieurs laboratoires (2). Cette étude a démontré la pertinence et la fiabilité de cet essaiaux fins prévues.

2. Le présentessai constitue une procédure de dépistage visant à détecter les substances qui peuvent se lier au hrERα. Il permet de déterminer la capacité d'un produit chimique d'essai à former les liaisons avec le DLL du hrERα en concurrence avec le 17β-œstradiol. Sur le plan quantitatif, l'essai peut livrer les résultats suivants: la CI_{50}, soit la concentration de produit chimique d'essai nécessaire pour remplacer la moitié du [^{3}H]-17β-œstradiol lié au hrERα, et les affinités de liaison relatives (ALR) vis-à-vis du hrERα des produits chimiques d'essai par rapport au 17β-œstradiol. L'essai visant à dépister les produits chimiques, les résultats acceptables sur le plan qualitatif sont la classification des produits chimiques d'essai soit comme ligand ou non-ligand du hrERα, soit comme équivoque, en fonction de critères définis à partir des courbes de liaison.

3. Étant donné que l'essai fait appel à un ligand radiomarqué, le laboratoire doit disposer d'une autorisation de manipuler des matériaux radioactifs. Toutes les procédures qui impliquent des isotopes radioactifs ou des produits chimiques dangereux doivent être conformes aux réglementations et aux procédures établies par la législation nationale.

4. Il convient de lire les parties «**INTRODUCTION GÉNÉRALE**» et «**ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE LIAISON AU hrER**» avant de mettre en œuvre le présent essai à des fins réglementaires. Les définitions et abréviations utilisées dans cette méthode d'essai sont indiquées à l'appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI (VOIR AUSSI INTRODUCTION GÉNÉRALE)

5. L'essai de liaison au hrERα repose principalement sur la mesure de la capacité d'un ligand radiomarqué ([^{3}H]-17β-œstradiol) à se lier aux ER en présence de concentrations croissantes de produit chimique d'essai (appelé «compétiteur»). Les produits chimiques d'essai qui présentent une forte affinité de liaison avec les ER entrent en concurrence avec le ligand radiomarqué à une concentration plus faible que les composés ayant une affinité moindre vis-à-vis du récepteur.

6. L'essai comporte deux grands éléments: une expérience de liaison à saturation pour établir les paramètres de l'interaction récepteur-ligand, puis une expérience de liaison compétitive visant à déterminer dans quelle mesure un produit chimique d'essai fait concurrence à un ligand radiomarqué pour se fixer aux ER.

▼M8

7. L'objectif de l'expérience de liaison à saturation est de caractériser le nombre et l'affinité de liaison des récepteurs dans un lot donné, dans la perspective de l'essai de liaison compétitive. L'expérience de liaison à saturation permet de mesurer, à l'équilibre, l'affinité d'une concentration fixe de récepteurs des œstrogènes vis-à-vis de leur ligand naturel (représentée par la constante de dissociation K_d), ainsi que la concentration de sites récepteurs actifs (B_{max}).

8. L'expérience de liaison compétitive détermine l'affinité d'une substance à se lier aux ER en concurrence avec le [^{3}H]-17β-œstradiol. Cette affinité est quantifiée par la concentration de produit chimique d'essai qui, à l'équilibre, inhibe 50 % des liaisons spécifiques du [^{3}H]-17β-œstradiol, appelée «concentration induisant 50 % d'inhibition» ou CI_{50}). Elle peut aussi s'exprimer par l'affinité de liaison relative (ALR, calculée par rapport à la CI_{50} de l'œstradiol mesurée séparément lors du même essai). L'expérience de liaison compétitive mesure la liaison aux ER du [^{3}H]-17β-œstradiol en concentration fixe en présence d'une large fourchette (huit ordres de grandeur) de concentrations du produit chimique d'essai. Les données sont ensuite ajustées, quand c'est possible, à une forme de l'équation de Hill (Hill, 1910) décrivant le remplacement du ligand radiomarqué par un compétiteur sur un site unique. L'ampleur du remplacement du ligand radiomarqué œstradiol à l'équilibre permet alors de caractériser le produit chimique d'essai comme ligand, non-ligand ou équivoque.

MODE OPÉRATOIRE

Démonstration de l'acceptabilité de la performance de la protéine hrER

9. Avant d'effectuer de manière routinière les essais de liaison à saturation et de liaison compétitive, il faut vérifier que chaque nouveau lot de hrERα fonctionne correctement dans le laboratoire où il doit être utilisé. Cette démonstration de la performance repose sur un processus en deux étapes:

— Essai de liaison à saturation avec du [^{3}H]-17β-œstradiol pour démontrer la saturation et la spécificité vis-à-vis du hrERα. Une analyse de régression non linéaire des données obtenues (p.ex. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) permettant d'obtenir une représentation de Scatchard, livrera l'affinité de liaison au hrERα du [^{3}H]-17β-œstradiol (K_d) ainsi que le nombre de récepteurs (B_{max}), pour un lot de hrERα donné.

— Essai de liaison compétitive avec les témoins (substance œstrogénique de référence [17β-œstradiol], ligand faible [noréthynodrel ou noréthindrone] et non-ligand [octyltriéthoxysilane, OTES]). Chaque laboratoire est tenu de créer une base de données historiques visant à documenter que la CI_{50} et les valeurs pertinentes relatives à la substance œstrogénique de référence et au ligand faible restent cohérentes d'une expérience à l'autre et d'un lot de hrERα à l'autre. Il faut que les paramètres des courbes de liaison compétitive obtenus pour les substances témoins demeurent dans les limites de l'intervalle de confiance à 95 % (voir tableau 1) déterminées grâce aux données des laboratoires participant à l'étude de validation de l'essai (2).

Tableau 1

Critères de performance établis pour la substance œstrogénique de référence et le ligand faible dans l'essai de liaison au hrER du CERI.

Substance	Paramètre	Moyenne [a]	Écart-type(n)	Intervalle de confiance à 95 % [b]	
				Limite minimale	Limite maximale
17β-estradiol	Sommet	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Base	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43

▼M8

Substance	Paramètre	Moyenne [a]	Écart-type(n)	Intervalle de confiance à 95 % [b]	
				Limite minimale	Limite maximale
	Pente de Hill	–1,22	0,20 (70)	–1,27	–1,17
	$LogCI_{50}$	–8,93	0,23 (70)	–8,98	–8,87
Noréthynodrel	Sommet	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Base	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Pente de Hill	–1,04	0,21 (68)	–1,09	–0,99
	$LogCI_{50}$	–6,19	0,40 (68)	–6,29	–6,10
Noréthindrone [c]	Sommet	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Base	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Pente de Hill	–1,18	0,32 (23)	–1,31	–1,04
	$LogCI_{50}$	–6,01	0,54 (23)	–6,25	–5,78

[a] Les valeurs moyenne ± écart-type (ET) pour l'échantillon de taille (n) ont été calculées à partir d'estimations des paramètres d'ajustement des courbes (équation de Hill à quatre paramètres) issus des essais sur les témoins réalisés par quatre laboratoires dans le cadre de l'étude de validation (voir annexe N de la référence 2).

[b] Les intervalles de confiance à 95 % sont fournis à titre d'orientation pour les critères d'acceptabilité.

[c] L'essai avec la noréthindrone était optionnel pour le volet IV de l'étude de validation (voir référence 2, Subtask IV). Ainsi, les valeurs moyennes ± ET (n) ont été calculées grâce aux estimations des paramètres d'ajustement des courbes (équation de Hill à quatre paramètres) issus des essais sur les témoins réalisés par deux laboratoires.
La gamme des CI50 dépendra de la Kd de la préparation de récepteurs et de la concentration du ligand radiomarqué utilisée par chaque laboratoire. Il est admis d'effectuer les ajustements appropriés pour la fourchette des CI50 en fonction des conditions de mise en œuvre de l'essai.

Démonstration des compétences du laboratoire

10. Voir les paragraphes 17 et 18 ainsi que le tableau 2 de la partie «**ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE LIAISON AU hrER**» de la présente méthode d'essai. Chaque essai (liaison à saturation et liaison compétitive) se compose de trois essais indépendants (utilisant de nouvelles dilutions du récepteur, des produits chimiques et des réactifs) réalisés trois jours différents, chacun d'entre eux comportant trois réplicats.

Détermination de la concentration de récepteur (hrERα)

11. La concentration de récepteurs actifs varie légèrement en fonction des lots et des conditions de stockage. C'est pourquoi il convient de déterminer la concentration de récepteurs actifs du lot livré par le fournisseur. Cette étape permet d'obtenir la concentration exacte de récepteurs actifs au moment de l'essai.

12. Dans les mêmes conditions que l'essai de liaison compétitive, donc avec 0.5 nM de [^{3}H]-œstradiol, des concentrations nominales de 0,1, 0,2, 0,4 et 0,6 nM de récepteur sont incubées en absence (liaison totale) et en présence (liaison non spécifique) d'œstradiol non marqué à 1 μM. La liaison spécifique est calculée en soustrayant la liaison non spécifique de la liaison totale,

▼M8

puis reportée graphiquement en fonction de la concentration nominale de récepteur. La concentration de récepteur pour laquelle la liaison spécifique correspond à 40 % du ligand radiomarqué ajouté permet de déduire la concentration de récepteur. C'est cette dernière qui est utilisée pour les expériences de liaison à saturation et de liaison compétitive. Souvent, cette condition sera remplie par une concentration finale de hrER de 0,2 nM.

13. Si le critère des 40 % échoue à plusieurs reprises, il faut chercher d'éventuelles erreurs dans le montage expérimental. L'incapacité à satisfaire le critère des 40 % peut suggérer que le lot de récepteurs recombinants contient très peu de sites actifs; il faut alors envisager d'employer un autre lot.

Essai à saturation

14. Huit concentrations croissantes de [^{3}H]-17β-œstradiol sont évaluées en triple exemplaire en respectant les trois conditions suivantes (voir tableau 2):

a. En absence de 17β-œstradiol non marqué et en présence d'ER. Cette condition permet de déterminer la liaison totale en mesurant la radioactivité des puits ne contenant que le [^{3}H]-17β-œstradiol.

b. En présence d'une concentration de 17β-œstradiol non marqué deux mille fois plus importante que celle du 17β-œstradiol radiomarqué et en présence d'ER. Cette condition vise à saturer les sites de liaison actifs avec le 17β-œstradiol non marqué et à déterminer la liaison non spécifique déduite de la radioactivité des puits. En effet, on considère que le reste d'œstradiol chaud (radiomarqué) capable de se lier au récepteur se fixe sur des sites non spécifiques, car l'œstradiol froid (non marqué) doit être en tel excès qu'il occupe tous les sites spécifiques disponibles sur les récepteurs.

c. En absence de 17β-œstradiol non marqué et en absence d'ER (détermination de la radioactivité totale)

Préparation des solutions de [^{3}H]-17β-œstradiol, de 17β-œstradiol non marqué et de hrERα

15. Une solution de [3H]-17β-œstradiol à 40 nM est préparée à partir d'une solution mère de [^{3}H]-17β-œstradiol à 1 µM dans le DMSO dans laquelle on ajoute du DMSO jusqu'à obtenir 200 nM, puis de la solution tamponnée à température ambiante jusqu'à 40 nM. Cette solution à 40 nM est alors diluée avec de la solution tamponnée à température ambiante pour préparer la série de solutions de [^{3}H]-17β-œstradiol allant de 0,313 à 40 nM (conformément à la colonne 12 du tableau 2).es concentrations d'essai finales, qui vont de 0,0313 à 4,0 nM, sont obtenues par ajout de 10 µl des dilutions précédentes dans chaque puits d'une plaque microtitre 96 puits (voir tableaux 2 et 3). La préparation de la solution d'essai tamponnée, la caractérisation de la solution mère de [^{3}H]-17β-œstradiol à partir de son activité spécifique ainsi que la préparation des dilutions et la détermination des concentrations sont décrites en détail dans le protocole du CERI (2).

16. Les dilutions des solutions de 17β-œstradiol non marqué sont préparées en ajoutant la solution d'essai tamponnée à la solution mère de 17β-œstradiol à 1 nM de manière à obtenir huit concentrations croissantes allant d'abord de 0,625 à 80 µM. Les concentrations d'essai finales, de 0,0625 à 4,0 µM, sont obtenues par ajout de 10 µl de ces dilutions dans chaque puits d'essai d'une plaque microtitre 96 puits servant à mesurer la liaison non spécifique (voir tableaux 2 et 3). La préparation des dilutions de 17β-œstradiol non marqué est décrite en détail dans le protocole du CERI (2).

▼**M8**

17. C'est la concentration de récepteur pour laquelle on obtient une liaison spécifique de 40 ± 10 % qui est choisie pour l'essai (voir paragraphes 12-13). La solution de hrERα est préparée immédiatement avant l'essai avec de la solution d'essai tamponnée glaciale, une fois que tous les puits servant à déterminer la liaison totale, la liaison non spécifique et contenant le ligand chaud uniquement ont été préparés.

18. Les plaques microtitre 96 puits sont préparées conformément au tableau 2, avec 3 réplicats par concentration de [^{3}H]-17β-œstradiol. La répartition des volumes de [^{3}H]-17β-œstradiol, de 17β-œstradiol non marqué, de solution tamponnée et de récepteur est indiquée dans le tableau 3.

Tableau 2

Organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison à saturation

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Pour mesurer la LT			Pour mesurer la LNS			Pour mesurer le ligand chaud seul				Dilutions de E2 non marqué pour les colonnes 4 à 6 de la plaque	Dilutions de [^{3}H] E2 pour les colonnes 1 à 9 de la plaque
A	0,0313 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0313 nM [^{3}H] E2+ 0,0625 µM E2+ ER			0,0313 nM				0,625 µM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0625 nM [^{3}H] E2+ 0,125 µM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 µM	0,625 nM
C	0,125 nM [^{3}H] E2+ ER			0,125 nM [^{3}H] E2+ 0,25 µM E2+ ER			0,125 nM				2,5 µM	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3}H] E2+ ER			0,250 nM [^{3}H] E2+ 0,5 µM E2+ ER			0,250 nM				5 µM	2,5 nM
E	0,50 nM [H] E2+ ER			0,50 nM [^{3}H] E2+ 1 µM E2+ ER			0,50 nM				10 µM	5 nM
F	1,00 nM [^{3}H] E2+ ER			1,00 nM [^{3}H] E2+ 2 µM E2+ ER			1,00 nM				20 µM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H] E2+ ER			2,00 nM [^{3}H] E2+ 4 µM E2+ ER			2,00 nM				40 µM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H] E2+ ER			4,00 nM [^{3}H] E2+ 8 µM E2+ ER			4,00 nM				80 µM	40 nM

LT: liaison totale,
LNS: liaison non spécifique
[^{3}H] E2: [^{3}H]-17β-œstradiol
E2: 17β-œstradiol non marqué
(*) Les concentrations indiquées sont les concentrations finales dans chaque puits.
(**) Les dilutions de E2 non marqué et de [3H] E2 peuvent être préparées sur une autre plaque.

▼M8

Tableau 3

Volumes de réactif dans la plaque microtitre de l'essai de liaison à saturation

Numéro de colonne		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Étapes de préparation		Puits LT			Puits LNS			Puits ligand chaud		
Volume d'éléments à verser dans le puits d'essai, et ordre d'ajout	Solution tamponnée	60 µl			50 µl			90 µl		
	E2 non marqué de la colonne 11 du tableau 2	–			10 µl			–		
	[^{3}H] E2 de la colonne 12 du tableau 2	10 µ			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			–		
Volume d'essai total		100 µl			100 µl			100 µl		
Incubation		**APRÈS 2 HEURES DE RÉACTION PAR INCUBATION**						Quantification de la radioactivité immédiatement après préparation. Pas d'incubation		
Ajout de DCC à 0,4 %		Oui			Oui			Non		
Volume de DCC à 0,4 %		100 µl			100 µl			—		
Filtration		Oui			Oui			Non		
MESURE DES DPM										
Volume de quantification ajouté au mélange de scintillation		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) En cas d'utilisation d'un compteur à scintillation pour plaque microtitre pour mesurer les désintégrations par minute, le ligand chaud seul ne peut être préparé sur la même plaque que les puits servant à déterminer la LT et la LNS. Le ligand chaud seul est alors préparé sur une autre plaque.

(**) Si le DCC est séparé par centrifugation, les 50 µl de surnageant doivent être analysés par comptage par scintillation liquide afin d'éviter la contamination par le DCC.

19. Les plaques d'essai microtitre servant à déterminer la liaison totale et la liaison non spécifique sont incubées à température ambiante (entre 22 et 28 °C) pendant deux heures.

Mesure du [^{3}H]-17β-œstradiol lié au hrERα

20. À l'issue des deux heures d'incubation, le [^{3}H]-17β-œstradiol lié au hrERα est séparé du [^{3}H]-17β-œstradiol libre par ajout de 100 µl d'une suspension glaciale de DCC à 0,4 % dans chaque puits. Les plaques sont alors placées sur la glace pendant 10 minutes, puis le mélange réactionnel et la suspension de DCC sont passés sur un filtre pour plaque microtitre afin d'éliminer le DCC. On prélève alors 100 µl de filtrat, qui sont ajoutés au scintillateur liquide dans des flacons de CSL en vue d'établir les désintégrations par minute (dpm) de chaque flacon grâce au comptage par scintillation.

▼M8

21. À défaut d'un filtre pour plaque microtitre, il est également possible d'éliminer le DCC par centrifugation. Les 50 µl de surnageant comprenant le [^{3}H]-17β-œstradiol lié au hrERα sont alors prélevés très soigneusement pour éviter de contaminer les puits par contact avec le DCC, puis soumis au comptage par scintillation.

22. Le ligand chaud seul permet de définir les désintégrations par minute (dpm) du [^{3}H]-17β-œstradiol ajouté aux puits d'essai. La radioactivité est mesurée juste après la préparation des puits correspondants. Ces puits ne reçoivent pas de suspension de DCC, et leur contenu est transféré directement dans le scintillateur liquide. Ils indiquent la quantité de [^{3}H]-17β-œstradiol (exprimée en dpm) ajoutée à chaque série de puits pour la liaison totale et la liaison non spécifique.

Essai de liaison compétitive

23. L'essai de liaison compétitive mesure les liaisons de [^{3}H]-17β-œstradiol en concentration fixe en présence de concentrations croissantes de produit chimique d'essai. Il requiert trois réplicats simultanés pour chaque concentration. En outre, trois essais non simultanés sont réalisés pour chaque produit chimique d'essai. L'essai nécessite au moins une plaque microtitre 96 puits.

Témoins

24. Le solvant et les témoins concomitants (substance œstrogénique de référence, ligand faible et non-ligand) doivent être inclus dans chaque expérience de l'essai. Pour chaque essai, une même plaque sert à établir les courbes pour toutes les concentrations de la substance œstrogénique de référence et des témoins (ligand faible et non-ligand). Toutes les autres plaques doivent contenir (i) une concentration élevée (remplacement maximal, quand le ligand remplace presque entièrement le ligand radiomarqué) et une concentration moyenne (correspondant environ à la CI_{50}) d'E2 et du ligand faible en triple exemplaire; (ii) les témoins avec solvant et des ligands non spécifiques, chacun en triple exemplaire. Les procédures de préparation de la solution d'essai tamponnée, des solutions de [^{3}H]-17β-œstradiol, de hrERα et du produit chimique d'essai sont décrites en détail dans le protocole du CERI (2).

Témoin avec solvant:

25. Le témoin avec solvant indique que ce dernier n'interagit pas avec le système d'essai et permet en outre de mesurer la liaison totale (LT). De préférence, on choisira le DMSO comme solvant. Si la concentration maximale du produit chimique d'essai n'est pas soluble dans le DMSO, il est aussi possible d'avoir recours à l'éthanol. La concentration de DMSO dans les puits en fin d'essai doit être 2.05 %, mais pourra aller jusqu'à 2.5 % si le produit chimique d'essai n'est pas assez soluble. Les concentrations de DMSO supérieures à 2.5 % sont proscrites car les concentrations de solvant plus élevées interfèrent avec l'essai. Pour les produits chimiques d'essai insolubles dans le DMSO mais solubles dans l'éthanol, on pourra utiliser jusqu'à 2 % d'éthanol dans l'essai sans que cela crée d'interférence.

Témoin avec solution tamponnée:

26. Le témoin avec solution tamponnée (TST) contient tous les éléments de l'essai sauf le solvant et le produit chimique d'essai. Les résultats du TST sont comparés à ceux du témoin avec solvant afin de vérifier que le solvant utilisé ne perturbe pas le système d'essai.

▼**M8**

Ligand fort (substance œstrognique de reference)

27. Le 17β-œstradiol (CAS 50-28-2) est le ligand endogène qui présente une forte affinité de liaison aux ER de type alpha. Il convient de tracer une courbe de référence pour le 17β-œstradiol non marqué pour chaque essai de liaison compétitive aux hrERα, afin d'évaluer la variabilité des essais répétés au fil du temps dans le même laboratoire. Huit solutions de 17β-œstradiol non marqué sont préparées dans du DMSO et de la solution d'essai tamponnée afin d'obtenir les concentrations finales suivantes dans les puits d'essai: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10} et 10^{-11} M. Ces concentrations permettent de tracer la courbe de référence. La concentration maximale de 17β-œstradiol non marqué (1 μM) sert également d'indicateur de liaison non spécifique (LNS); elle est donc codée «LNS» dans le tableau 4, même si elle fait également partie de la courbe de référence.

Ligand faible

28. Un ligand faible (noréthynodrel [CAS68-23-5] ou noréthindrone [CAS 68-22-4]) est inclus pour démontrer la sensibilité de chaque expérience et évaluer la variabilité au fil des répétitions de l'essai. Huit solutions de ligand faible sont préparées dans du DMSO et de la solution d'essai tamponnée afin d'obtenir les concentrations finales suivantes dans les puits d'essai: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} et enfin 10^{-9} M.

Non-ligand

29. On fera appel à l'octyltriéthoxysilane (OTES, CAS 2943-75-1) pour servir de témoin négatif (non-ligand). Ce composé permet de vérifier que tel qu'il est mis en œuvre, l'essai détermine les produits chimiques d'essai qui ne se lient pas au hrERα. Huit solutions de non-ligand sont préparées dans du DMSO et de la solution d'essai tamponnée afin d'obtenir les concentrations finales suivantes dans les puits d'essai: 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9} et 10^{-10} M. Il est aussi possible d'avoir recours au phtalate de dibutyle (DBP, CAS 84-72-2) comme non-ligand, mais en limitant la concentration maximale analysée à 10^{-4} M. En effet, il est attesté que la solubilité maximale du DBP dans l'essai s'élève à 10^{-4} M.

Concentration de hrERα

30. C'est la quantité de récepteur pour laquelle on obtient une liaison spécifique de 40 ± 10 % qui est choisie pour l'essai (voir paragraphes 12–13 de l'appendice 3). La solution de hrERα est préparée par dilution des hrERα fonctionnels dans de la solution d'essai tamponnée glaciale, juste avant son utilisation.

[^{3}H]-17β-œstradiol

31. La concentration finale de [^{3}H]-17β-œstradiol dans les puits d'essai doit être 0,5 nM.

Produits chimiques d'essai

32. Un premier essai s'impose pour déterminer la limite de solubilité de chaque produit chimique d'essai ainsi que la fourchette de concentrations qui convient pour l'essai. La limite de solubilité de chaque produit chimique d'essai est d'abord déterminée dans le solvant, puis confirmée dans les conditions de l'essai. La concentration finale utilisée dans l'essai ne doit pas dépasser 1 mM. L'essai de détermination de l'ordre de grandeur s'effectue avec un témoin du solvant et une série logarithmique d'au moins huit dilutions de la concentration maximale acceptable (p.ex. 1 mM ou moins, selon la limite de solubilité). On relève alors l'apparition d'un trouble ou

▼M8

d'un précipité (voir aussi le paragraphe 35 de l'appendice 3). Dès que l'ordre de grandeur convenant à l'essai est établi, le produit chimique est testé sous forme d'une série de huit concentrations en série logarithmique dont les intervalles sont définis par l'essai de détermination de l'ordre de grandeur précédent. S'il y a lieu, on pourra ajuster plus finement les concentrations testées dans les deuxième et troisième expériences de façon à mieux caractériser la courbe concentration-réponse.

33. Les dilutions du produit chimique d'essai sont préparées dans le solvant approprié (voir paragraphe 25 de l'appendice 3). Si la concentration maximale du produit chimique d'essai n'est soluble ni dans le DMSO, ni dans l'éthanol, et si l'ajout de solvant supplémentaire pouvait se traduire par un dépassement de la concentration maximale de solvant acceptable dans le puits en fin d'essai, c'est la concentration immédiatement inférieure qui fait office de concentration maximale. Le cas échéant, il est possible d'ajouter une concentration supplémentaire au début de la série de concentrations, les autres concentrations demeurant inchangées.

34. On observera attentivement les puits au moment d'y verser les solutions de produit chimique d'essai, car cet ajout peut provoquer un précipité. Les données relatives à tous les puits qui contiennent un précipité sont exclues de l'ajustement des courbes, et la raison de cette exclusion est consignée.

35. Si d'autres sources fournissent des données sur le $\log(CI_{50})$ d'un produit chimique d'essai, il peut être judicieux de répartir les dilutions géométriquement autour du $\log(CI_{50})$ attendu (p.ex. à 0,5 unité logarithmique). Les résultats finaux doivent correspondre à une fourchette de concentrations suffisamment étendue de part et d'autre du $\log(CI_{50})$, comprenant le «sommet» et la «base» de la courbe de liaison afin de pouvoir la caractériser correctement.

Organisation de la plaque d'essai

36. Les plaques microtitre étiquetées doivent inclure six réplicats respectivement pour le témoin avec solvant, la concentration maximale de substance œstrogénique de référence (E2) servant aussi d'indicateur de liaison non spécifique (LNS) et le témoin avec solution tamponnée, ainsi que les incubations en triple exemplaire de chacune des huit concentrations du témoin non ligand (octyltriéthoxysilane), les sept concentrations inférieures de la substance œstrogénique de référence (E2), les huit concentrations du ligand faible (noréthynodrel or noréthindrone) et les huit concentrations de chaque produit chimique d'essai (PCE). Un exemple d'organisation de la plaque d'essai pour obtenir des courbes complètes à partir de toutes les concentrations de la substance œstrogénique de référence et des témoins est fourni ci-dessous dans le tableau 4. Des plaques microtitre supplémentaires sont utilisées pour le produit chimique d'essai, et comprennent aussi les témoins suivants: (i) une concentration élevée (remplacement maximal) et une concentration moyenne (correspondant environ à la CI_{50}) d'E2 et du ligand faible, en triple exemplaire; (ii) le témoin avec solvant (liaison totale) et les puits pour la LNS, en six réplicats (tableau 5). Un exemple d'organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison compétitive de trois produits chimiques d'essai inconnus est disponible dans l'appendice 3.3. Les concentrations indiquées dans cette représentation ainsi que dans les tableaux 4 et 5 font référence aux concentrations finales mises en œuvre dans chaque puits d'essai. La concentration maximale d'E2 doit s'élever à 1×10^{-7} M, tandis que pour le ligand faible, c'est la concentration maximale de la plaque 1 qui est utilisée. Le laboratoire détermine la CI_{50} à partir de sa base de données historiques. Cette valeur doit être similaire à celle observée dans les études de validation (voir tableau 1).

▼**M8**

Tableau 4

Organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison compétitive (1) (2)**, courbes concentration-réponse complètes pour la substance œstrogénique de référence et les témoins (plaque 1)**

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Témoin avec solution tamponnée et témoin positif (E2)			Témoin faiblement positif (Noréthynodrel)			Témoin négatif (OTES)			LT et LNS		
A	Blanc (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			LT (témoin du solvant) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1\times10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			LNS (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1\times10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1\times10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Témoin avec solution tamponnée		
F	E2 ($1\times10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1\times10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Blanc (E2 chaud) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1\times10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

(1) Organisation des échantillons pour la plaque microtitre standard à analyser pour chaque essai.
(2) Notez que cette plaque microtitre est préparée avec les dilutions obtenues dans la plaque de dilution conformément aux normes des sections précédentes.
Dans cet exemple, le ligand faible est le noréthynodrel (NE).
(*) Blanc réel, puits non utilisé.
(**) Blanc non utilisé pendant l'incubation, mais servant à confirmer la radioactivité totale ajoutée.

Tableau 5

Organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison compétitive, plaques supplémentaires pour les produits chimiques d'essai (PCE) et les témoins de la plaque

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Produit chimique d'essai-1 (PCE-1)			Produit chimique d'essai-2 (PCE-2)			Produit chimique d'essai-3 (PCE-3)			Témoins		
A	PCE-1 (1×10^{-10} M)			PCE-2 (1×10^{-10} M)			PCE-3 (1×10^{-10} M)			E_2 ($_{1\times10^{-7}}$M)		
B	PCE-1 (1×10^{-9} M)			PCE-2 (1×10^{-9} M)			PCE-3 (1×10^{-9} M)			E_2 (IC_{50})		
C	PCE-1 (1×10^{-8} M)			PCE-2 (1×10^{-8} M)			PCE-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1\times10^{-4.5}$M)		
D	PCE-1 (1×10^{-7} M)			PCE-2 (1×10^{-7} M)			PCE-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	PCE-1 (1×10^{-6} M)			PCE-2 (1×10^{-6} M)			PCE-3 (1×10^{-6} M)			LNS (10^{-6} M E_2)		
F	PCE-1 (1×10^{-5} M)			PCE-2 (1×10^{-5} M)			PCE-3 (1×10^{-5} M)					
G	PCE-1 (1×10^{-4} M)			PCE-2 (1×10^{-4} M)			PCE-3 (1×10^{-4} M)			LT (témoin avec solvant)		
H	PCE-1 (1×10^{-3} M)			PCE-2 (1×10^{-3} M)			PCE-3 (1×10^{-3} M)					

Dans cet exemple, le ligand faible est le noréthynodrel (NE)

▼M8

Mise en œuvre de l'essai de liaison compétitive

37. Tous les puits, à l'exception de ceux qui servent à déterminer la liaison totale et les puits à blanc (avec le ligand chaud) indiqués dans le tableau 6, reçoivent 50 µl de solution d'essai tamponnée, ensuite mélangée avec 10 µl, selon le cas, de témoin avec solvant, de substance œstrogénique de référence (E2), de ligand faible, de non-ligand et de produit chimique d'essai, puis 10 µl d'une solution de [^{3}H]-17β-œstradiol à 5 nM. En dernier lieu, les puits de chaque plaque reçoivent 30 µl de solution de récepteur glaciale, et sont agités modérément. La solution de hrERα est le dernier réactif ajouté. Les plaques d'essai microtitre sont alors incubées à température ambiante (entre 22 et 28 °C) pendant deux heures.

Tableau 6

Volume des éléments de l'essai de liaison compétitive au hrER, plaques microtitre

Étapes de préparation		Puits autres que LT	Puits LT	Blanc (E2 chaud)
Volume d'éléments à verser dans le puits d'essai, et ordre d'ajout	Solution d'essai tamponnée à température ambiante	50 µl	60 µl	90 µl
	E2 non marqué, ligand faible, non-ligand, solvant et produits chimiques d'essai (*)	10 µl	—	—
	[3H]-17β-œstradiol en quantité suffisante pour une concentration finale de 0,5 nM (soit 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	Concentration de hrERα préétablie (voir paragraphes 12-13)	30 µl	30 µl	—
Volume total dans chaque puits d'essai		100 µl	100 µl	100 µl

(*) Préparés manière à obtenir une concentration finale de solvant acceptable

38. Le [^{3}H]-17β-œstradiol lié au hrERα est séparé du [^{3}H]-17β-œstradiol libre en ajoutant 100 µl d'une suspension glaciale de DCC dans chaque puits, puis quantifié en suivant la méthode décrite dans les paragraphes 21-23 de l'appendice 3 relativement à l'essai de liaison à saturation.

39. Les puits G10 à G12 et H10 à H12 («blanc (E2 chaud)» dans le tableau 4) fournissent les désintégrations par minute du [^{3}H]-17β-œstradiol dans 10 µl Les aliquotes de 10 µl sont versées directement dans le scintillateur liquide.

Critères d'acceptabilité

Essai de liaison à saturation

40. La courbe de liaison spécifique doit atteindre un plateau pour les concentrations les plus élevées de [^{3}H]-17β-œstradiol, le cas échéant, ce qui traduit la saturation des hrERα avec le ligand.

41. Il faut que la liaison spécifique induite par le [^{3}H]-17β-œstradiol à 0,5 nM corresponde à une radioactivité égale à 30 à 50 % de la moyenne de la radioactivité totale mesurée dans tous les essais. On peut occasionnellement admettre quelques valeurs en dehors de cette fourchette, mais si les résultats de l'essai la dépassent régulièrement ou si un essai donné livre des résultats très éloignés de cette fourchette, il convient d'ajuster la concentration de protéine et de répéter l'essai de liaison à saturation.

▼M8

42. Les données doivent aboutir à une représentation de Scatchard linéaire.

43. La liaison non spécifique ne doit pas être excessive: elle est généralement inférieure à 35 % de la liaison totale. Le ratio de ces liaisons pourra néanmoins parfois dépasser ce chiffre s'agissant de mesurer des désintégrations par minutes très faibles pour la concentration d'essai de 17β-œstradiol radiomarqué la plus basse.

Essai de liaison compétitive

44. Des concentrations croissantes de 17β-œstradiol non marqué doivent déplacer le [^{3}H]-17β-œstradiol des récepteurs selon un modèle de liaison compétitive sur un seul site.

45. Il faut que la CI_{50} de la substance œstrogénique de référence (le 17β-œstradiol) soit environ égale à la concentration molaire de [^{3}H]-17β-œstradiol plus la K_d établie grâce à l'essai de liaison à saturation.

46. La liaison spécifique totale doit rester cohérente et s'élever à 40 ± 10 % lorsque la concentration moyenne de la radioactivité totale ajoutée à chaque puits vaut 0.5 nM pour tous les essais. On peut occasionnellement admettre quelques valeurs en dehors de cette fourchette, mais si les résultats de l'essai la dépassent régulièrement ou si un essai donné livre des résultats très éloignés de cette fourchette, il convient d'ajuster la concentration de protéine.

47. Le solvant ne doit pas modifier la sensibilité ou la reproductibilité de l'essai. Les résultats du témoin avec solvant (puits TS) sont comparés à ceux du témoin avec solution tamponnée (TST) afin de vérifier que le solvant utilisé ne perturbe pas le système d'essai. Quand le solvant n'a aucun effet sur l'essai, les résultats correspondant au TS et au TST sont comparables.

48. Le non-ligand ne doit pas remplacer plus de 25 % du [^{3}H]-17β-œstradiol lié au hrERα à des concentrations allant jusqu'à 10^{-3} M (OTES) ou 10^{-4} M (DBP).

49. Des critères de performance ont été définis pour la substance œstrogénique de référence et pour les deux ligands faibles (p.ex. noréthynodrel ou noréthindrone) à partir des données de l'étude de validation de l'essai de liaison au hrER du CERI (annexe N de la référence 2). Les intervalles de confiance à 95 % fournis découlent des valeurs moyennes ± ET (n) obtenues dans l'ensemble des essais sur les témoins effectués par quatre laboratoires participant à l'étude de validation. Les intervalles de confiance à 95 % ont été calculés pour les paramètres d'ajustement des courbes (p.ex. sommet, base, pente de Hill et $logCI_{50}$) correspondant à la substance œstrogénique de référence et aux ligands faibles ainsi que pour le log_{10}ALR des ligands faibles par rapport à la substance œstrogénique de référence. Le tableau 1 présente les fourchettes attendues pour les paramètres d'ajustement des courbes, qui peuvent faire office de critères de performance. En pratique, la fourchette de la CI_{50} peut varier légèrement en fonction de la K_d déduite de la préparation de récepteurs déterminée par les expériences et en fonction de la concentration d'essai du ligand.

50. Aucun critère de performance n'a été établi pour les paramètres d'ajustement des courbes correspondant aux produits chimiques d'essai du fait de la grande diversité des composés potentiellement testés ainsi que des affinités et résultats correspondants (p.ex. ajustement complet, partiel ou nul des courbes). On fera toutefois appel à un avis professionnel pour analyser les résultats de chaque essai sur une substance. Il convient d'avoir recours à une fourchette de concentrations d'essai suffisante pour définir clairement le

▼M8

sommet de la courbe de liaison compétitive (p.ex. pour induire 90 à 100 % de liaison). La variabilité entre les réplicats de chaque concentration du produit chimique d'essai et entre les trois essais non simultanés doit rester raisonnable et défendable sur le plan scientifique. Il est nécessaire que les témoins utilisés pour chaque essai sur un produit chimique d'essai soient proches des mesures de la performance documentées pour cet essai du CERI, et en harmonie avec les données historiques obtenues pour les témoins par chaque laboratoire.

ANALYSE DES DONNÉES

Essai de liaison à saturation

51. Cet essai mesure la liaison totale et la liaison non spécifique. Ces valeurs permettent de calculer la liaison spécifique induite par des concentrations croissantes de [^{3}H]-17β-œstradiol à l'équilibre, en soustrayant la liaison non spécifique de la liaison totale. La courbe reportant la liaison spécifique en fonction de la concentration de [^{3}H]-17β-œstradiol doit atteindre un plateau pour la liaison spécifique maximale, qui indique la saturation des hrERα par le [^{3}H]-17β-œstradiol. De plus, l'analyse des données documente la liaison du [^{3}H]-17β- œstradiol à un site de liaison unique à haute affinité. Il faut que la courbe de liaison à saturation présente les liaisons non spécifique, totale et spécifique. Une régression non linéaire (p.ex. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) permet d'approfondir l'analyse des données, et les résultats sont finalement présentés sous forme d'une représentation de Scatchard.

52. L'analyse des données doit déterminer la B_{max} et la K_d en se fondant uniquement sur les données de liaison totale, étant supposé que la liaison non spécifique est linéaire, à moins de justifier le recours à une autre méthode. Par ailleurs, on détermine le meilleur ajustement des courbes à l'aide d'une analyse de régression solide, une justification étant nécessaire dans le cas contraire. La méthode choisie pour cette analyse de régression solide sera indiquée. On appliquera toujours une correction relative à la perte de ligand (p.ex. avec la méthode de Swillens, 1995) pour déterminer la B_{max} et la K_d à partir des données de liaison à saturation.

Essai de liaison compétitive

53. La courbe de liaison compétitive représente la liaison spécifique du [^{3}H]-17β-œstradiol en fonction de la concentration (en log10) du compétiteur. La concentration de produit chimique d'essai qui inhibe 50 % de liaison spécifique maximale du [^{3}H]-17β-œstradiol correspond à la CI_{50}.

54. Des estimations des log(CI_{50}) des témoins positifs (p.ex. substance œstrogénique de référence et ligand faible) sont obtenues grâce à un logiciel approprié d'ajustement de courbe par méthode non linéaire d'après une équation de Hill à quatre paramètres (p.ex. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Ces ajustements se font sans imposer de limites au sommet, à la base, à la pente et au log(CI_{50}) des courbes. Le meilleur ajustement des courbes est établi grâce à une analyse de régression solide, une justification étant nécessaire dans le cas contraire. Aucune correction n'est effectuée pour la perte de ligand. Après l'analyse initiale, chaque courbe de liaison est examinée pour vérifier qu'elle est bien ajustée au modèle. L'affinité de liaison relative (ALR) du ligand faible est exprimée en pourcentage à partir du rapport entre le log(CI_{50}) du ligand faible et le log(CI_{50}) du 17β-œstradiol. Les résultats des témoins positifs et du témoin non ligand sont évalués à partir des mesures de la performance de l'essai indiquées dans les paragraphes 44-49 de l'appendice 3.

▼**M8**

55. Les données obtenues pour tous les produits chimiques d'essai doivent être analysées par étape pour veiller à l'évaluation appropriée des résultats et à la classification correcte de chaque courbe de liaison compétitive. Ainsi, pour chaque essai sur une substance, il est d'abord recommandé d'effectuer une analyse des données normalisée identique à celle utilisée pour la substance œstrogénique de référence et les témoins avec ligand de faible affinité (voir paragraphe 54 de l'appendice 3). Cette étape est suivie d'un examen technique de l'ajustement des paramètres de la courbe et d'un examen visuel pour déterminer dans quelle mesure les données correspondent à la courbe de liaison compétitive obtenue pour chaque essai. Cet examen technique repose sur trois observations indiquant que l'essai et les analyses ont été réalisés correctement: une baisse du pourcentage de [^{3}H]-17β-œstradiol lié aux sites spécifiques en fonction de la concentration, une faible variabilité entre les réplicats techniques de chaque concentration de produit chimique d'essai et la cohérence des paramètres d'ajustement entre les trois essais.

Interprétation des données

56. Sous réserve du respect de l'ensemble des critères d'acceptabilité, un produit chimique d'essai est considéré comme ligand du hrERα si sa courbe de liaison peut être ajustée et si le point le plus bas de la courbe de réponse obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison inférieure à 50 % (graphique 1).

57. Sous réserve du respect de l'ensemble des critères d'acceptabilité, un produit chimique d'essai est considéré comme non-ligand du hrERα si:

— sa courbe de liaison peut être ajustée et si le point le plus bas de la courbe de réponse ajustée obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison supérieure à 75 %, ou

— sa courbe de liaison ne peut pas être ajustée et si la moyenne des pourcentages de liaison non lissés de tous les groupes de concentration de l'essai est supérieure à 75 %.

58. Les produits chimiques d'essai sont considérés comme équivoques si aucune des conditions qui précèdent n'est satisfaite (p.ex. le point le plus bas de la courbe de réponse ajustée correspond à une liaison située entre 76 et 51 %).

Tableau 7

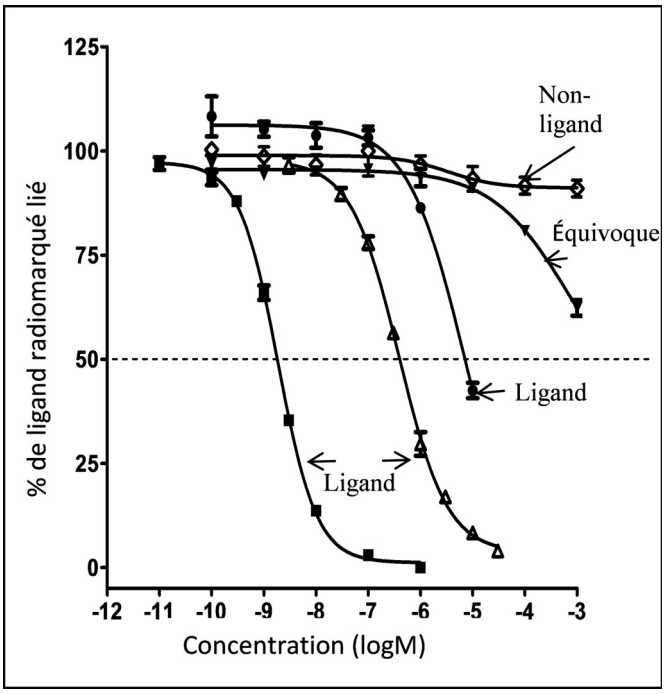
Critères de classification d'un produit chimique d'essai fondée sur sa courbe de liaison compétitive

Classification	Critères
Ligand[a]	Il est possible d'ajuster la courbe. Le **point le plus bas de la courbe de réponse obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison inférieure à 50 %.**
Non-ligand[b]	S'il est possible d'ajuster la courbe, le **point le plus bas de la courbe de réponse ajustée obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison supérieure à 75 %.** S'il n'est pas possible d'ajuster la courbe, la **moyenne des pourcentages de liaison non lissés de tous les groupes de concentration de l'essai est supérieure à 75 %.**
Équivoque[c]	Essai évaluable qui ne peut être classé ni comme ligand, ni comme non-ligand (P.ex. le point le plus bas de la courbe de réponse ajustée correspond à une liaison située entre 76 et 51 %.)

▼M8

Graphique 1

Exemples de classification d'un produit chimique d'essai grâce à la courbe de liaison compétitive



59. Les différents essais réalisés par un laboratoire sur une substance sont combinés en attribuant des valeurs numériques à chaque essai et en calculant la moyenne de ces valeurs, comme l'indique le tableau 8. Les résultats combinés des essais de chaque laboratoire sont alors comparés à la classification attendue pour chaque produit chimique d'essai.

Tableau 8

Méthode de classification d'un produit chimique d'essai à partir de plusieurs essais dans un même laboratoire

Attribution d'une valeur à chaque essai:	
Classification	**Valeur numérique**
Ligand	2
Équivoque	1
Non-ligand	0
Classification selon la moyenne des valeurs numériques de toutes les expériences:	
Classification	**Valeur numérique**
Binder	Moyenne ≥ 1,5
Equivoque	0,5 ≤ moyenne < 1,5
Non-binder	Moyenne < 0,5

RAPPORT D'ESSAI

60. Voir le paragraphe 24 de la partie «ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE LIAISON AU hrER» de la présente méthode d'essai.

▼**M8**

Appendice 3.1

LIST DE TERMES

[^{3}H]E2: 17β-œstradiol radiomarqué au tritium

DCC: *dextran-coated charcoal* (charbon enrobé de dextrane)

E2: 17β-œstradiol non marqué (inerte)

Solution d'essai tamponnée: solution de 10 mM de Tris-HCl à pH 7.4, avec 1 mM d'EDTA, 1 mM d'EGTA, 1 mM de NaVO3, 10 % de glycérol, 0,2 mM de leupeptine, 1 mM de dithiothréitol et 10 mg/ml d'albumine sérique bovine

hrERα: récepteur des œstrogènes alpha recombinant humain (domaine de liaison du ligand)

Réplicat: un des multiples puits qui contiennent les mêmes éléments, aux mêmes concentrations, et sont testés simultanément dans un même essai. Le présent protocole prévoit que chaque concentration du produit chimique d'essai soit soumise à l'essai en triple exemplaire, c'est-à-dire que trois réplicats de chacune d'elle sont testés simultanément.

Essai: série complète d'expériences simultanées dans les puits d'une plaque microtitre livrant l'ensemble des données nécessaires pour caractériser l'affinité de liaison au hrERα d'un produit chimique d'essai, soit la quantité totale de [^{3}H]-17β-œstradiol ajoutée dans un puits, la liaison maximale au hrERα du [^{3}H]-17β-œstradiol, la liaison non spécifique et la liaison totale pour diverses concentrations de le produit chimique d'essai. Un essai peut reposer sur un seul puits d'essai (réplicat) par concentration, mais dans la mesure où le présent protocole exige des expériences en triple exemplaire, un essai fait appel à trois puits d'essai par concentration. De plus, le présent protocole impose de réaliser trois essais indépendants (non simultanés) par produit chimique.

▼**M8**

Appendice 3.2

ORGANISATION DES PUITS POUR L'ESSAI DE LIAISON COMPÉTITIVE

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur (M)	Volume de la solution mère hrER (µl)	Volume de la solution tamponnée (µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur (M)
S	A1	1	Blanc	B	B1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Blanc	B	B2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Blanc	B	B3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	E2 froid	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B2	2	E2 froid	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B3	3	E2 froid	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	C1	1	E2 froid	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C2	2	E2 froid	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C3	3	E2 froid	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	D1	1	E2 froid	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	D2	2	E2 froid	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	D3	3	E2 froid	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	E1	1	E2 froid	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E2	2	E2 froid	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E3	3	E2 froid	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	F1	1	E2 froid	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	F2	2	E2 froid	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	F3	3	E2 froid	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	G1	1	E2 froid	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08

▼**M8**

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur (M)	Volume de la solution mère hrER (µl)	Volume de la solution tamponnée (µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur (M)
S	G2	2	E2 froid	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	G3	3	E2 froid	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	H1	1	E2 froid	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H2	2	E2 froid	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H3	3	E2 froid	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	A4	1	noréthynodrel	NE	LF1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A5	2	noréthynodrel	NE	LF1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A6	3	noréthynodrel	NE	LF1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B4	1	noréthynodrel	NE	LF2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B5	2	noréthynodrel	NE	LF2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B6	3	noréthynodrel	NE	LF2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C4	1	noréthynodrel	NE	LF3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	C5	2	noréthynodrel	NE	LF3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	C6	3	noréthynodrel	NE	LF3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	D4	1	noréthynodrel	NE	LF4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D5	2	noréthynodrel	NE	LF4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D6	3	noréthynodrel	NE	LF4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	E4	1	noréthynodrel	NE	LF5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	E5	2	noréthynodrel	NE	LF5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	E6	3	noréthynodrel	NE	LF5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07

▼**M8**

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur (M)	Volume de la solution mère hrER (µl)	Volume de la solution tamponnée (µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur (M)
S	F4	1	noréthynodrel	NE	LF6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F5	2	noréthynodrel	NE	LF6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F6	3	noréthynodrel	NE	LF6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	G4	1	noréthynodrel	NE	LF7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	G5	2	noréthynodrel	NE	LF7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	G6	3	noréthynodrel	NE	LF7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	H4	1	noréthynodrel	NE	LF8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	H5	2	noréthynodrel	NE	LF8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	H6	3	noréthynodrel	NE	LF8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06

▼**M8**

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur (M)	Volume de la solution mère hrER (µl)	Volume de la solution tamponnée (µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur (M)
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	A10	1	liaison totale	LT	LT1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	liaison totale	LT	LT2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	liaison totale	LT	LT3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	liaison totale	LT	LT4	—	30	60	10	—	100	-
S	B11	5	liaison totale	LT	LT5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	liaison totale	LT	LT6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	E2 froid (élevé) (high)	LNS	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	C11	2	E2 froid (élevé)	LNS	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	C12	3	E2 froid (élevé)	LNS	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D10	4	E2 froid (élevé)	LNS	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D11	5	E2 froid (élevé)	LNS	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06

▼**M8**

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur (M)	Volume de la solution mère hrER (µl)	Volume de la solution tamponnée (µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur (M)
S	D12	6	E2 froid (élevé)	LNS	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E10	1	Témoin tampon	TST	TST1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	Témoin tampon	TST	TST2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	Témoin tampon	TST	TST3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	Témoin tampon	TST	TST4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	Témoin tampon	TST	TST5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	Témoin tampon	TST	TST6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	Blanc (E2 chaud)	Chaud	H1	—	90	—	10	—	100	-
S	G11 (*)	2	Blanc (E2 chaud)	Chaud	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	Blanc (E2 chaud)	Chaud	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	Blanc (E2 chaud)	Chaud	H4	—	90	—	10	—	100	—

▼**M8**

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur (M)	Volume de la solution mère hrER (µl)	Volume de la solution tamponnée (µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur (M)
S	H11 (*)	5	Blanc (E2 chaud)	Chaud	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	Blanc (E2 chaud)	Chaud	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	Inconnu 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A2	2	Inconnu 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A3	3	Inconnu 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B1	1	Inconnu 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B2	2	Inconnu 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B3	3	Inconnu 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C1	1	Inconnu 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C2	2	Inconnu 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C3	3	Inconnu 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D1	1	Inconnu 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D2	2	Inconnu 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D3	3	Inconnu 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E1	1	Inconnu 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E2	2	Inconnu 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E3	3	Inconnu 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F1	1	Inconnu 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F2	2	Inconnu 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F3	3	Inconnu 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G1	1	Inconnu 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G2	2	Inconnu 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G3	3	Inconnu 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H1	1	Inconnu 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H2	2	Inconnu 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03

▼**M8**

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur (M)	Volume de la solution mère hrER (µl)	Volume de la solution tamponnée (µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur (M)
P1	H3	3	Inconnu 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A4	1	Inconnu 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A5	2	Inconnu 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A6	3	Inconnu 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B4	1	Inconnu 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B5	2	Inconnu 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B6	3	Inconnu 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C4	1	Inconnu 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C5	2	Inconnu 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C6	3	Inconnu 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D4	1	Inconnu 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D5	2	Inconnu 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D6	3	Inconnu 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E4	1	Inconnu 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E5	2	Inconnu 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E6	3	Inconnu 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F4	1	Inconnu 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F5	2	Inconnu 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F6	3	Inconnu 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G4	1	Inconnu 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G5	2	Inconnu 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G6	3	Inconnu 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H4	1	Inconnu 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H5	2	Inconnu 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H6	3	Inconnu 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A7	1	Inconnu 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A8	2	Inconnu 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10

▼**M8**

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur (M)	Volume de la solution mère hrER (µl)	Volume de la solution tamponnée (µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur (M)
P1	A9	3	Inconnu 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B7	1	Inconnu 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B8	2	Inconnu 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B9	3	Inconnu 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C7	1	Inconnu 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C8	2	Inconnu 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C9	3	Inconnu 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D7	1	Inconnu 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D8	2	Inconnu 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D9	3	Inconnu 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E7	1	Inconnu 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E8	2	Inconnu 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E9	3	Inconnu 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F7	1	Inconnu 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F8	2	Inconnu 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F9	3	Inconnu 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G7	1	Inconnu 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G8	2	Inconnu 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G9	3	Inconnu 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H7	1	Inconnu 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H8	2	Inconnu 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H9	3	Inconnu 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A10	1	Témoin E2 (max)	S	E2max1	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A11	2	Témoin E2 (max)	S	E2max2	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A12	3	Témoin E2 (max)	S	E2max3	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	B10	1	Témoin E2 (CI50)	S	$E2CI_{50}1$	$E2IC_{50}x10$	30	50	10	10	100	$E2CI_{50}$

▼**M8**

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur (M)	Volume de la solution mère hrER (µl)	Volume de la solution tamponnée (µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur (M)
P1	B11	2	Témoin E2 (CI50)	S	$E2CI_{50}2$	$E2IC_{50}x10$	30	50	10	10	100	$E2CI_{50}$
P1	B12	3	Témoin E2 (CI50)	S	$E2CI_{50}3$	$E2IC_{50}x10$	30	50	10	10	100	$E2CI_{50}$
P1	C10	1	Témoin NE (max)	S	NEmax1	1.00E-3.5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	C11	2	Témoin NE (max)	S	NEmax2	1.00E-3.5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	C12	3	Témoin NE (max)	S	NEmax3	1.00E-3.5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	D10	1	Témoin NE (IC50)	S	$NECI_{50}1$	$NECI_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NECI_{50}$
P1	D11	2	Témoin NE (IC50)	S	$NECI_{50}2$	$NECI_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NECI_{50}$
P1	D12	3	Témoin NE (IC50)	S	$NECI_{50}3$	$NECI_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NECI_{50}$
P1	E10	1	E2 froid (élevé)	LNS	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E11	2	E2 froid (élevé)	LNS	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E12	3	E2 froid (élevé)	LNS	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F10	4	E2 froid (élevé)	LNS	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F11	5	E2 froid (élevé)	LNS	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F12	6	E2 froid (élevé)	LNS	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	G10	1	liaison totale	LT	LT1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	liaison totale	LT	LT2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	liaison totale	LT	LT3	—	30	60	10	—	100	—

▼**M8**

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur (M)	Volume de la solution mère hrER (µl)	Volume de la solution tamponnée (µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur (M)
P1	H10	4	liaison totale	LT	LT4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	liaison totale	LT	LT5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	liaison totale	LT	LT6	—	30	60	10	—	100	-

(*) Veuillez noter que les puits codés «chaud» sont vides pendant l'incubation. Les 10 µl qui y sont ensuite ajoutés ne servent qu'au comptage par scintillation.

▼**M8**

Appendice 4

OBSERVATIONS RELATIVES À L'ANALYSE DES DONNÉES DE L'ESSAI DE LIAISON COMPÉTITIVE AU HRER

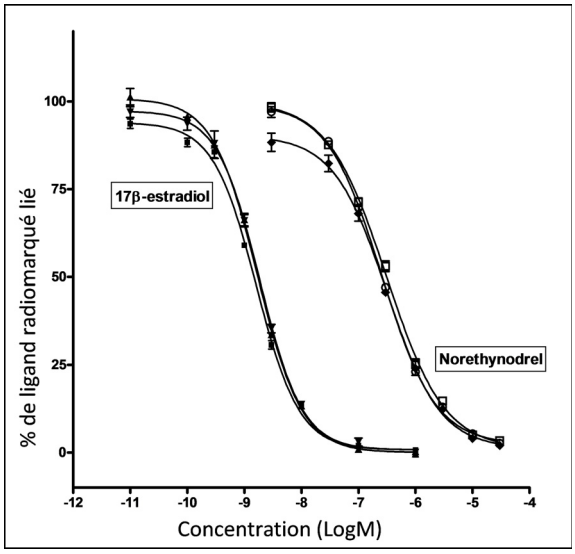
1. L'essai de liaison compétitive au hrERα mesure la liaison d'une concentration fixe de [^{3}H]-17β-œstradiol en présence de concentrations croissantes de produit chimique d'essai. La courbe de liaison compétitive présente la liaison spécifique du [^{3}H]-17β-œstradiol en fonction de la concentration (en $\log_{10}$) du compétiteur. La concentration de produit chimique d'essai qui inhibe 50 % de la liaison spécifique maximale du [^{3}H]-17β-œstradiol correspond à la CI_{50}.

Analyse des données obtenues pour la substance œstrogénique de référence et le ligand faible (1)

2. Les données des essais sur les témoins sont transformées (en pourcentage de liaison spécifique du [^{3}H]-17β-œstradiol et logarithme de la concentration de la substance témoin) pour les analyses ultérieures. Des estimations des $\log(CI_{50})$ des témoins positifs (p.ex. substance œstrogénique de référence et ligand faible) sont obtenues grâce à un logiciel approprié d'ajustement de courbe par méthode non linéaire d'après une équation de Hill à quatre paramètres (p.ex. BioSoft; GraphPad Prism) (2). Ces ajustements se font généralement sans imposer de limites au sommet, à la base, à la pente et au $\log(CI_{50})$ des courbes. Le meilleur ajustement des courbes est établi grâce à une solide analyse de régression, une justification étant nécessaire dans le cas contraire. La méthode choisie pour cette solide analyse de régression sera indiquée. Les essais de liaison au hrER de FW et du CERI ne requièrent pas de correction relative à la perte de ligand, mais il est possible d'y avoir recours, s'il y a lieu. Après l'analyse initiale, chaque courbe de liaison est examinée pour vérifier qu'elle est bien ajustée au modèle. L'affinité de liaison relative (ALR) du ligand faible peut être exprimée en pourcentage à partir du rapport entre le $\log(CI_{50})$ du ligand faible et le $\log(CI_{50})$ du 17β-œstradiol. Les résultats obtenus pour les témoins positifs et négatifs doivent être évalués à l'aide des critères de performance de l'essai et d'acceptabilité décrits dans la présente méthode d'essai (paragraphe 20), dans l'appendice 2 (essai de FW, paragraphes 41-51) et dans l'appendice 3 (essai du CERI, paragraphes 41-51). Des exemples illustrant trois essais sur la substance œstrogénique de référence et le ligand faible sont présentés dans le graphique 1.

Graphique 1

Exemples de courbes de liaison compétitive pour la substance œstrogénique de référence et le ligand faible témoin.



▼**M8**

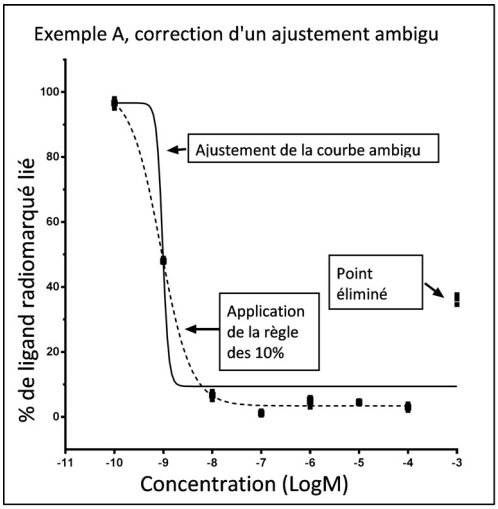
Analyse des données des produits chimiques d'essai

3. Les données obtenues pour tous les produits chimiques d'essai doivent être analysées par étape pour veiller à l'évaluation appropriée des résultats et à la classification correcte de chaque courbe de liaison compétitive. Chaque essai sur un produit chimique d'essai donne d'abord lieu à une analyse des données normalisée identique à celle qui est utilisée pour la substance œstrogénique de référence et les témoins avec ligand de faible affinité. Cette étape est suivie d'un examen technique de l'ajustement des paramètres de la courbe et d'un examen visuel pour déterminer dans quelle mesure les données correspondent à la courbe de liaison compétitive obtenue pour chaque essai. Cet examen technique repose sur trois observations indiquant que l'essai et les analyses ont été réalisés correctement: une baisse du pourcentage de [^{3}H]-17β-œstradiol lié aux sites spécifiques en fonction de la concentration, une faible variabilité entre les réplicats techniques de chaque concentration de produit chimique d'essai et la cohérence des paramètres d'ajustement entre les trois essais. On fera appel à un avis professionnel pour examiner les résultats de chaque essai d'un produit chimique d'essai, et les données utilisées pour classer un produit chimique d'essai comme ligand ou non-ligand doivent être défendables sur le plan scientifique.

4. Il peut arriver que certaines expériences exigent une attention supplémentaire pour analyser et interpréter convenablement les données de liaison au hrER. En effet, des études attestent que dans certains cas, l'analyse et l'interprétation des données de liaison compétitive au récepteur peuvent être compliquées par une remontée du pourcentage de liaison spécifique pour les concentrations d'essai les plus élevées (graphique 2). Ce problème bien connu est survenu pendant la mise en œuvre des protocoles dans plusieurs essais de liaison compétitive au récepteur (3). Dans ce genre de situation, la réponse dépend de la concentration à basse concentration, mais lorsque cette dernière approche de la limite de solubilité, le [^{3}H]-17β-œstradiol cesse d'être remplacé par le produit chimique d'essai. Le cas échéant, les données obtenues pour les concentrations élevées indiquent que la limite biologique de l'essai est atteinte. Par exemple, ce phénomène est souvent associé à une insolubilité chimique et à une précipitation à forte concentration; il peut aussi traduire un dépassement de la capacité du DCC à piéger le ligand radiomarqué libre pendant la procédure de séparation, pour les concentrations d'essai les plus élevées. Conserver ces points lors de l'ajustement des données de liaison compétitive à une courbe sigmoïde pourrait entraîner une mauvaise classification de l'affinité de liaison aux ER du produit chimique d'essai (graphique 2). Pour éviter cette situation, le protocole des essais de liaison au hrER de FW et du CERI permet d'exclure des points de données de l'analyse lorsque la moyenne du pourcentage de liaison spécifique du [^{3}H]-17β-œstradiol pour tous les réplicats dépasse d'au moins 10 % la moyenne de la liaison observée à une concentration inférieure. Cette règle communément appelée «règle des 10 %» ne peut être appliquée qu'une seule fois par courbe, et l'analyse doit se faire à partir des données de six concentrations au minimum afin de classer la courbe correctement.

Graphique 2

Exemples de courbes de liaison compétitive avec ou sans application de la règle des 10 %

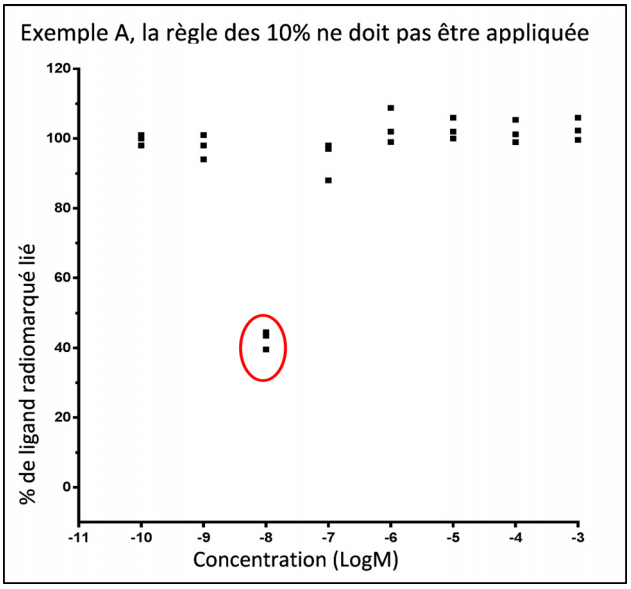


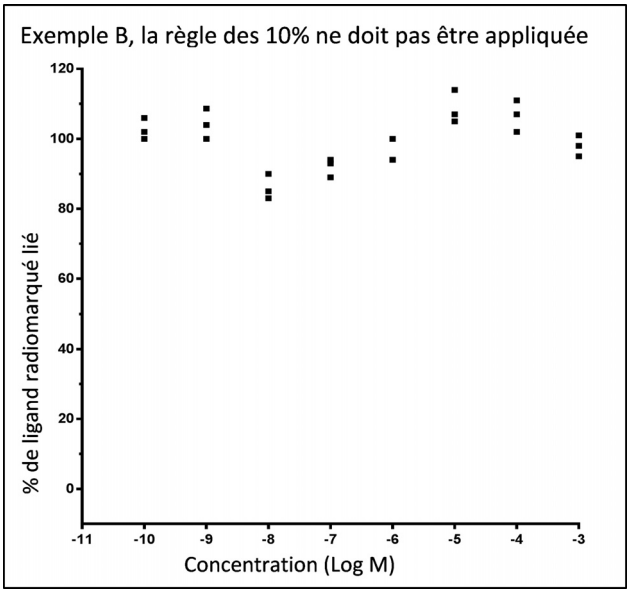
▼**M8**

5. On examinera prudemment s'il convient d'appliquer la règle des 10 % pour corriger les courbes concernées, règle réservée aux substances chimiques qui ont de fortes chances d'être des ligands du hrER. Au fil des expériences de l'étude de validation de l'essai de liaison au hrER de FW, il a été relevé que la règle des 10 % pouvait avoir des conséquences involontaires et inattendues. En effet, des produits chimiques n'interagissant pas avec le récepteur (donc non-ligands) affichaient souvent une variabilité supérieure à 10 % sur toute la fourchette de concentrations d'essai quand la liaison du ligand radiomarqué était proche de 100 %. Si la liaison la plus basse correspondait à une faible concentration, l'application de la règle des 10 % pouvait entraîner l'élimination des données obtenues pour toutes les concentrations supérieures, bien qu'elles puissent servir à démontrer que le produit chimique d'essai est un non-ligand. Le graphique 3 présente des exemples dans lesquels il ne faut pas appliquer la règle des 10 %.

Graphique 3

Exemples de courbes de liaison compétitive dans lesquelles il ne faut pas appliquer la règle des 10 %





▼**M8**

Références

(1) OCDE (2015), Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Série sur les essais et évaluations n° 226, OCDE, Paris.

(2) Motulsky H. et Christopoulos A. (2003), The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression. GraphPad Software Inc., San Diego (Californie), p. 187-191. Disponible à l'adresse: [www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf]

(3) Laws S.C., Yavanhxay S., Cooper R.L., Eldridge J.C. (2006), Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors. *Toxicological Sci*. 94(1): p. 46-56.

▼M8

B.71. ESSAIS DE SENSIBILISATION CUTANÉE *IN VITRO* PORTANT SUR L'ÉVÉNEMENT CLÉ RELATIF À L'ACTIVATION DES CELLULES DENDRITIQUES DANS LA VOIE TOXICOLOGIQUE IMPLIQUÉE DANS LES EFFETS INDÉSIRABLES (AOP) DE SENSIBILISATION CUTANÉE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Méthode d'essai fondée sur l'événement clé relatif à l'activation des cellules dendritiques

1. Un sensibilisant cutané est une substance qui provoque une réponse allergique suite à un contact avec la peau, selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations unies (SGH) (1) et du règlement (CE) n° 1272/2008 de l'Union européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (le «règlement CLP») ([1]). Les principales phases du processus biologique de sensibilisation cutanée font l'objet d'un consensus général. Dans le cadre du programme de l'OCDE sur les AOP (2), les connaissances dont on dispose sur les mécanismes chimiques et biologiques associés à la sensibilisation cutanée ont été résumées sous la forme d'un AOP (Adverse Outcome Pathway) ou voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables, allant de l'événement moléculaire initiateur jusqu'aux effets indésirables sur la santé du type dermatite de contact allergique, en passant par les étapes intermédiaires. Dans le cas présent, l'événement moléculaire initiateur (le premier événement clé) est l'établissement d'une liaison covalente entre des substances chimiques électrophiles et les centres nucléophiles des protéines de la peau. Le deuxième événement clé sur cet AOP se déroule dans les kératinocytes et comprend des réponses inflammatoires et des changements d'expression génique, liés à des voies de signalisation cellulaire spécifiques telles que les voies dépendant de l'élément de réponse antioxydant/électrophile (ARE, Antioxidant Response Element). Le troisième événement clé est l'activation des cellules dendritiques (DC), habituellement évaluée d'après l'expression de marqueurs de surface spécifiques de la cellule, les chimiokines et les cytokines. Le quatrième événement clé est la prolifération et l'activation des lymphocytes T, évaluée indirectement par l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL) chez la souris (3).

2. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice (LD) 442E (2017) de l'OCDE. Elle décrit les essais *in vitro* portant sur les mécanismes de l'événement clé relatif à l'activation des cellules dendritiques dans l'AOP de sensibilisation cutanée (2). La méthode d'essai comprend des essais utilisés pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés, selon le SGH de l'ONU et le règlement CLP.

   Les essais décrits dans la présente méthode d'essai sont les suivants:

   — test d'activation de la lignée cellulaire humaine (h-CLAT),

   — test d'activation de la lignée cellulaire U937 (U-SENS™)

   — essai par gène rapporteur de l'interleukine 8 (essai IL-8 Luc)

3. Les essais décrits dans la présente méthode d'essai et dans la ligne directrice correspondante de l'OCDE peuvent différer sur les plans de la procédure employée pour générer les données et des résultats mesurés, mais ils peuvent s'utiliser indifféremment pour répondre aux exigences des pays en matière de résultats d'essais portant sur l'événement clé relatif à l'activation des cellules dendritiques dans l'AOP de sensibilisation cutanée, tout en bénéficiant de l'acceptation mutuelle des données de l'OCDE.

([1]) Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006, JO L 353 du 31.12.2008, p. 1.

▼M8

Fondements et principes des essais inclus dans la méthode d'essai fondée sur les événements clés

4. Traditionnellement, l'évaluation de la sensibilisation cutanée a fait appel à l'expérimentation animale. Les méthodes classiques qui utilisent un cobaye – le test de maximisation chez le cobaye (GPMT) de Magnusson et Kligman et le test de Buehler, également chez le cobaye (méthode d'essai B.6) (4) – portent sur les phases d'induction et d'élicitation de la sensibilisation cutanée. Les essais chez la souris – l'ELGL (méthode d'essai B.42) (3) et ses deux variantes n'utilisant pas d'isotopes radioactifs, l'ELGL: DA (méthode d'essai B.50) (5) et l'ELGL: BrdU-ELISA (méthode d'essai B.51) (6) – portant tous trois sur la réponse à l'induction exclusivement, se sont également imposés, car ils présentent l'avantage, par rapport aux tests sur le cobaye, de préserver davantage le bien-être animal et de fournir une mesure objective de la phase d'induction de la sensibilisation cutanée.

5. Récemment, des méthodes d'essai de type mécanistique in chemico ou in vivo portant sur le premier événement clé de l'AOP de sensibilisation cutanée [méthode d'essai B.59: essai de liaison directe sur la réactivité peptifique (DPRA)] (7) ou sur le deuxième événement clé de l'AOP de sensibilisation cutanée (méthode d'essai B.60: essai ARE-Nrf2 luciférase) (8) ont été adoptées pour contribuer à l'évaluation du potentiel de sensibilisation des produits chimiques.

6. Les essais décrits dans la présente méthode d'essai permettent de quantifier, au choix, soit les variations d'expression de marqueurs de surface associés au processus d'activation des monocytes et des DC suite à l'exposition à un sensibilisant (CD54 et CD86, par exemple), soit les changements d'expression de l'IL-8, une cytokine associée à l'activation des DC. Il a été signalé que les sensibilisants cutanés induisent l'expression de marqueurs membranaires associés à l'activation des DC (2) tels que CD40, CD54, CD80, CD83 et CD86, induisent aussi des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1β et TNF-α, ainsi que plusieurs chimiokines parmi lesquelles IL-8 (CXCL8) et CCL3 (9) (10) (11) (12).

7. Cependant, l'activation des DC n'est qu'un des événements clés de l'AOP sensibilisation cutanée (2) (13), les informations fournies par les essais mesurant uniquement les marqueurs de l'activation des DC peuvent ne pas suffire à elles seules pour conclure à l'absence de pouvoir de sensibilisation cutanée des produits chimiques. Par conséquent, les données obtenues avec les essais décrits dans la présente LD peuvent apporter une aide à l'identification des sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH de l'ONU/CLP) et des non-sensibilisants, dans le cadre d'une approche intégrée (IATA), en combinant ces données à d'autres informations complémentaires provenant par exemple d'essais *in vitro* portant sur d'autres phases de l'AOP sensibilisation cutanée, ainsi que de méthodes non expérimentales telles que la prévision à partir de données croisées (*read-across*) relatives à des produits chimiques similaires (13). On trouvera dans la littérature des exemples d'utilisation des données obtenues avec ces essais suivant des approches définies, c'est-à-dire des approches normalisées au regard des sources d'information et des procédures d'analyse des données à des fins de prédictions (13). Ces données peuvent constituer des éléments utiles dans le cadre d'une démarche IATA.

8. Les essais décrits dans cette méthode d'essai ne peuvent pas être utilisés seuls, ni pour le classement des sensibilisants cutanés dans les sous-catégories 1A et 1B du SGH de l'ONU/CLP par les autorités chargées d'appliquer ces deux sous-catégories optionnelles, ni pour prédire la puissance de sensibilisation dans le cadre d'évaluations de sécurité. Cependant, en fonction du cadre réglementaire applicable, des résultats positifs avec ces méthodes peuvent être considérés comme suffisants à eux seuls pour classer un produit chimique dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU/CLP.

▼M8

9. Dans la présente méthode d'essai, le terme «produit chimique d'essai» désigne ce qui est testé ([1]) et ne fait pas référence à l'applicabilité des essais pour tester les substances mono-constituants, les substances multi-constituants ou les mélanges. On dispose actuellement d'informations limitées sur l'applicabilité des essais à des substances multi-constituants ou à des mélanges (14) (15). Les essais sont néanmoins techniquement applicables aux essais de substances multi-constituants et de mélanges. Toutefois, avant d'appliquer la présente méthode d'essai à un mélange pour obtenir des données à des fins réglementaires, il convient de vérifier si et, dans l'affirmative, pourquoi les résultats peuvent être acceptables dans le cadre réglementaire imposé ([2]). Cette vérification n'est pas nécessaire si l'essai du mélange répond à une exigence réglementaire. De plus, en cas d'essai portant sur des substances multi-constituants ou des mélanges, il convient de tenir compte de l'interférence possible de la cytotoxicité des constituants avec les réponses observées.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Nations Unies (2015). Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). Sixième édition révisée. New York & Genève: Publications des Nations unies. ISBN: 978-92-1-117087-0. Disponible à l'adresse suivante: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.

(2) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Série sur les essais et évaluations N° 168. Disponible à l'adresse suivante: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(201210/PART1&docLanguage=En).

(3) Chapitre B.42 de la présente annexe: essai de stimulation locale des ganglions lympathiques. Chapitre B.6 de la présente annexe: sensibilisation cutanée.

(4) Chapitre B.6 de la présente annexe: sensibilisation cutanée.

(5) Chapitre B.50 de la présente annexe: sensibilisation cutanée: essai de stimulation locale des ganglions lymphatique: DA.

(6) Chapitre B.51 de la présente annexe: essai de sensibilisation cutanée: essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques: BrdU-ELISA.

(7) Chapitre B.59 de la présente annexe: sensibilisation cutanée in chemico: essai de liaison directe sur la réactivité peptidique (DPRA).

(8) Chapitre B.60 de la présente annexe: sensibilisation cutanée in vitro: méthode d'essai ARE-Nrf2 Luciferase.

(9) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271-96.

(10) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. J Exp Med 180:1841-7.

(11) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. Eur J Immunol 27:3031-8.

([1]) En juin 2013, la Réunion conjointe de l'OCDE est convenue que, dans la mesure du possible, le terme «substance chimique d'essai» devrait être employé de façon plus cohérente pour désigner ce qui est soumis à l'essai dans les lignes directrices nouvelles ou révisées de l'OCDE.

([2]) Ce libellé a été proposé et approuvé lors de la réunion EPOC (WNT) d'avril 2014

▼**M8**

(12) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and DNCB. J Invest Dermatol 120:390-8.

(13) OCDE (2016). Série sur les essais et évaluations N° 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris. Disponible à l'adresse suivante: https://community.oecd.org/community/iatass.

(14) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(15) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

▼**M8**

Appendice 1

SENSIBILISATION CUTANÉE IN VITRO: TEST D'ACTIVATION DE LA LIGNÉE CELLULAIRE HUMAINE (H-CLAT)

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

1. L'essai h-CLAT permet de quantifier les variations d'expression des marqueurs de surface cellulaires associés au processus d'activation des monocytes et des DC (CD86 et CD54), dans la lignée cellulaire de leucémie monocytaire humaine THP-1, à la suite de l'exposition à des sensibilisants (1) (2). Le niveau d'expression mesuré pour les marqueurs de surface cellulaires CD86 et CD54 est utilisé pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés.

2. L'essai h-CLAT a fait l'objet d'une étude de validation coordonnée du Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les méthodes de substitution à l'expérimentation animale (EURL ECVAM), suivie d'un examen indépendant par des pairs sous la conduite du Comité scientifique consultatif (ESAC) de EURL ECVAM. Après analyse des données disponibles et sur avis des organismes de régulation et des parties prenantes, l'EURL ECVAM a recommandé l'utilisation de la méthode h-CLAT (3) dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA, pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants à des fins de classification et d'étiquetage des dangers. On trouvera dans la littérature des exemples d'utilisation des données h-CLAT combinées à d'autres sources d'information (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

3. Il a été démontré que l'essai h-CLAT est transférable à des laboratoires expérimentés dans les techniques de cultures cellulaires et de l'analyse par cytométrie en flux. Le niveau de reproductibilité attendu des prédictions obtenues par l'essai est de l'ordre de 80 % intra-laboratoire et 80 % inter-laboratoires (3) (12). L'étude de validation (13) et d'autres études publiées (14) ont permis de conclure que, par rapport aux résultats obtenus par la méthode ELGL, la précision de distinction entre sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH/CLP) et non-sensibilisants est de 85 % (N = 142), avec une sensibilité de 93 % (94/101) et une spécificité de 66 % (27/41) (d'après une nouvelle analyse de l'EURL ECVAM (12) prenant en compte toutes les données existantes mais excluant les résultats négatifs obtenus avec un coefficient de partage octanol-eau (log Koe) supérieur à 3,5 tel que décrit au paragraphe 4). Il est probable que les faux-négatifs dans les prédictions effectuées avec l'essai h-CLAT concernent davantage des produits chimiques ayant une puissance de sensibilisation de la peau faible à modérée (c'est-à-dire sous-catégorie 1B du SGH/CLP) que des produits chimiques ayant une puissance de sensibilisation de la peau élevée (c'est-à-dire sous-catégorie 1A du SGH/CLP) (4) (13) (15). L'ensemble de ces données montre l'utilité de l'essai h-CLAT comme élément contribuant à l'identification des dangers de sensibilisation cutanée. Cependant, les valeurs relatives à la précision de l'essai h-CLAT utilisé seul n'ont qu'un caractère indicatif, car cet essai doit être combiné à d'autres sources d'information dans le contexte d'une démarche IATA, et conformément aux dispositions énoncées aux paragraphes 7 et 8 de l'Introduction Générale. En outre, dans l'évaluation des méthodes d'étude de la sensibilisation cutanée sans expérimentation animale, il convient de tenir compte du fait que l'ELGL et les autres méthodes d'expérimentation animale ne reflètent peut-être pas parfaitement la situation chez l'être humain.

4. Les données actuellement disponibles montrent que la méthode h-CLAT est applicable à des produits chimiques couvrant divers groupes fonctionnels organiques, mécanismes réactionnels, puissances de sensibilisation cutanée (telles qu'établies par des études in vivo) et propriétés physico-chimiques (3) (14) (15). La méthode h-CLAT est applicable aux produits chimiques solubles ou formant une dispersion stable (colloïde ou suspension dans laquelle le produit chimique d'essai ne se dépose pas et ne se sépare pas du solvant/véhicule en formant plusieurs phases) dans un solvant/véhicule adapté (voir paragraphe 14). Les résultats pour les produits chimiques présentant un log Koe supérieur à 3.5 sont souvent des faux négatifs (14). Par conséquent, les résultats négatifs associés à des produits chimiques présentant un log Koe supérieur égal à 3.5 ne doivent pas être considérés. Cependant les résultats positifs associés à des produits chimiques présentant un log Koe supérieur

▼M8

égal à 3.5 peuvent quand même être utilisés pour étayer l'identification du produit chimique d'essai comme sensibilisant cutané. De plus, en raison des capacités métaboliques limitées de la lignée cellulaire utilisée (16) ainsi que des conditions expérimentales, les pro-haptènes (substances nécessitant une activation enzymatique, par exemple via des enzymes P450) et les pré-haptènes (substances activées par oxydation), en particulier ceux dont l'oxydation est lente, peuvent eux aussi donner des résultats négatifs avec le h-CLAT (15). Il est possible de tester des produits chimiques fluorescents avec le h-CLAT (17), néanmoins les produits fortement fluorescents qui émettent à la même longueur d'onde que l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou que l'iodure de propidium (IP) causent une interférence avec la détection par cytométrie en flux. Ces produits ne peuvent donc pas être adéquatement analysés avec des anticorps conjugués au FITC ou à l'IP. Dans ce cas, on peut recourir respectivement au marquage des anticorps par d'autres fluorochromes, ou à d'autres marqueurs de cytotoxicité, à condition qu'il soit démontré, par exemple en testant les substances d'épreuve de compétence citées à l'appendice 1-2, que ces techniques génèrent des résultats similaires aux anticorps marqués au FITC (voir paragraphe 24) ou à l'IP (voir paragraphe 18). À la lumière de ce qui précède, les résultats négatifs devront être interprétés dans le contexte des limites indiquées et combinés avec d'autres sources d'information dans le cadre d'une démarche IATA. S'il est démontré que la méthode h-CLAT n'est pas applicable à d'autres catégories spécifiques de produits chimiques d'essai, cette méthode ne doit pas leur être appliquée.

5. Comme indiqué ci-dessus, la méthode h-CLAT aide à distinguer les sensibilisants cutanés des non-sensibilisants. Cependant, utilisée dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA, elle peut aussi contribuer à l'évaluation de la puissance de sensibilisation (4) (5) (9). Des travaux complémentaires, s'appuyant de préférence sur des données humaines, seront toutefois nécessaires pour déterminer de quelle façon les résultats du h-CLAT pourraient venir à l'appui de ce type d'évaluation

6. Les définitions sont données à l'appendice 1.1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. La méthode *in vitro* h-CLAT permet de quantifier les variations d'expression de marqueurs de surface (CD86 et CD54) des cellules de la lignée cellulaire de leucémie monocytaire humaine THP-1, après une exposition de 24 heures à un produit chimique d'essai. Ces molécules de surface sont des marqueurs typiques de l'activation des monocytes THP-1 et peuvent imiter l'activation des DC, étape critique dans l'amorçage des lymphocytes T. La variation d'expression des marqueurs de surface est mesurée par cytométrie en flux après coloration cellulaire avec des anticorps marqués par fluorochrome. La cytotoxicité est mesurée en parallèle pour savoir si l'activation de l'expression des marqueurs de surface a lieu à des concentrations inférieures au niveau de cytotoxicité. L'intensité relative de fluorescence des marqueurs de surface, comparée à celle du témoin de solvant/véhicule, est calculée et utilisée dans un modèle prédictif (voir paragraphe 26), pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants.

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

8. Avant d'utiliser en routine l'essai décrit dans le présent appendice à la méthode d'essai B.71, les laboratoires devront faire la preuve de leurs compétences techniques, en appliquant la méthode aux dix substances d'épreuve listées à l'appendice 1.2. En outre, les utilisateurs de cet essai devront conserver une base de données historiques issues des contrôles de réactivité (voir paragraphe 11) et obtenues avec le témoin positif et le témoin de solvant/véhicule (voir paragraphes 20-22), et devront utiliser ces données pour confirmer que la reproductibilité de l'essai dans le temps au sein de leur laboratoire.

▼M8

PROCÉDURE

9. Le présent essai est basé sur le protocole h-CLAT du service de base de données sur les méthodes alternatives à l'expérimentation animale (DB-ALM, *DataBase service on Alternative Methods to animal experimentation* n° 158) (18), qui est celui qui a été utilisé pour l'étude de validation coordonnée par l'EURL ECVAM. Il est recommandé d'utiliser ce protocole lors de la mise en œuvre et de l'utilisation de la méthode h-CLAT au laboratoire. On trouvera dans ce qui suit une description des principaux éléments et modes opératoires de la méthode h-CLAT, qui comprend deux étapes: un *essai de détermination de la dose* et la *mesure de l'expression de CD86/CD54*.

Préparation des cellules

10. La méthode h-CLAT fait appel à la lignée cellulaire de leucémie monocytaire humaine, THP-1. Il est recommandé d'acquérir les cellules (TIB-202™) auprès d'une banque de cellules reconnue, par exemple l'*American Type Culture Collection*.

11. Les cellules THP-1 sont cultivées à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5 % CO_2, dans un milieu RPMI-1640 supplémenté avec 10 % de sérum bovin fœtal (SBF), 0.05 mM de 2-mercaptoéthanol, 100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Il est possible d'éviter l'ajout de pénicilline et de streptomycine dans le milieu. Cependant, dans ce cas, les utilisateurs devront vérifier que l'absence d'antibiotiques dans le milieu n'a aucun effet sur les résultats, par exemple en testant les substances d'épreuve indiquées à l'appendice 1-2. Quoi qu'il en soit, dans le but de minimiser le risque de contamination, les bonnes pratiques de culture cellulaire seront suivies, indépendamment de la présence ou non d'antibiotiques dans le milieu de culture cellulaire. Les cellules THP-1 sont repiquées régulièrement tous les 2 ou 3 jours, à une densité comprise entre 0.1 et 0.2 x 10^6 cellules/ml, et doivent être maintenues à une densité comprise entre 0.1 et 1 x 10^6 cellules/ml. Avant utilisation pour l'essai, les cellules doivent être qualifiées par un contrôle de réactivité. Ce contrôle doit être réalisé deux semaines après la décongélation, avec pour témoins positifs le 2,4-dinitrochlorobenzène (DNCB) (N° CAS 97-00-7, pureté ≥ 99 %) et le sulfate de nickel ($NiSO_4$) (N° CAS 10101-97-0, pureté ≥ 99 %) et pour témoin négatif l'acide lactique (AL) (N° CAS 50-21-5, pureté ≥ 85 %). Le DNCB et le $NiSO_4$ doivent tous deux générer des réponses positives à la fois pour les marqueurs de surface cellulaires CD86 et CD54. L'acide lactique doit générer une réponse négative à la fois pour les marqueurs de surface cellulaires CD86 et CD54. Seules les cellules ayant réussi le contrôle de réactivité sont utilisées pour l'essai. Les cellules peuvent être repiquées jusqu'à deux mois après décongélation, sans dépasser 30 repiquages. Le contrôle de réactivité doit être conduit selon les procédures décrites aux paragraphes 20-24.

12. . Pour l'essai, les cellules THP-1 sont ensemencées à une densité de 0,1 x 10^6 cellules/ml ou de 0,2 x 10^6 cellules/ml, et précultivées dans des flacons de culture pendant 72 h ou 48 h, respectivement. Il est important que la densité cellulaire dans le flacon de culture immédiatement après la période de pré-culture soit autant que possible la même dans chaque expérimentation (en suivant l'une des deux conditions de pré-culture ci-dessus). En effet, la densité cellulaire dans le flacon de culture immédiatement après la pré-culture peut influencer l'expression de CD86/CD54 induite par des allergènes (19). Le jour de l'essai, les cellules sont récoltées depuis le flacon de culture et suspendues à une densité de 2×10^6 cellules/ml dans un milieu frais. Les cellules sont ensuite ensemencées dans une plaque microtitre 24 puits à fond plat (500 µl, 1×10^6 cellules/puits), ou dans une plaque 96 puits à fond plat (80 µl, $1{,}6 \times 10^5$ cellules/puits).

Essai de détermination de la dose

13. Un essai de détermination de la dose est mené pour établir la valeur CV75, à savoir la concentration de produit chimique d'essai provoquant une viabilité cellulaire (CV) de 75 % comparé au témoin de solvant/véhicule. Cette valeur CV75 est utilisée pour déterminer la concentration de produits chimiques d'essai à utiliser lors de la mesure d'expression de CD86/CD54 (voir paragraphes 20-24).

▼**M8**

Préparation des produits chimiques d'essai et des témoins

14. Les produits chimiques d'essai et les substances témoins sont préparés le jour de l'essai. Dans la méthode h-CLAT, les produits chimiques d'essai sont dissous ou dispersés de façon stable (voir paragraphe 4), en choisissant de préférence comme solvant/véhicule une solution saline ou le milieu, ou, en deuxième option, dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, pureté ≥ 99 %) si le produit chimique d'essai n'est pas soluble ou ne forme pas une dispersion stable dans les deux solvants/véhicules précédents. Les concentrations finales sont de 100 mg/mL (solution saline ou milieu) ou de 500 mg/mL (DMSO). Il est possible d'utiliser d'autres solvants/véhicules que ceux indiqués ci-dessus, à condition que ce choix soit suffisamment étayé sur le plan scientifique. La stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant/véhicule final doit être prise en compte.

15. À partir des solutions mères de produits chimiques d'essai, à 100 mg/ml (solution saline ou milieu) ou à 500 mg/ml (DMSO), les dilutions suivantes sont effectuées:

— si le solvant/véhicule est la solution saline ou le milieu: huit solutions mères (huit concentrations) sont préparées par une série de dilutions de facteur 2 en utilisant le solvant/véhicule pertinent. Ces solutions mères sont ensuite diluées à nouveau par un facteur de 50 dans le milieu de culture (solutions de travail). Si la concentration finale maximale de 1 000 µg/ml dans la plaque n'est pas toxique, la concentration maximale doit être à nouveau déterminée en réalisant un autre essai de cytotoxicité. La concentration finale dans la plaque ne doit pas dépasser 5 000 µg/ml pour les produits chimiques d'essai dissous ou en dispersion stable dans la solution saline ou le milieu;

— si le solvant/véhicule est le DMSO: huit solutions mères (huit concentrations) sont préparées par une série de dilutions de facteur 2 en utilisant le solvant/véhicule pertinent. Ces solutions mères sont ensuite diluées à nouveau par un facteur de 250 dans le milieu de culture (solutions de travail). La concentration finale dans la plaque ne doit pas dépasser 1 000 µg/ml, même si cette concentration est non-toxique.

Les solutions de travail sont enfin utilisées pour l'exposition, en ajoutant le même volume de solution de travail au volume de cellules THP-1 en suspension dans la plaque (voir aussi paragraphe 17), pour parvenir à une dilution supplémentaire de facteur 2 (en général, les concentrations finales dans la plaque vont de 7,81 à 1 000 µg/ml).

16. Le témoin de solvant/véhicule utilisé pour la méthode h-CLAT est le milieu de culture (pour les produits chimiques d'essai dissous ou en dispersion stable (voir paragraphe 4) dans le milieu ou dans la solution saline), ou le DMSO (pour les produits chimiques d'essai dissous ou en dispersion stable dans le DMSO). Ce témoin est testé à une concentration finale unique de 0,2 % dans la plaque. On effectue la même dilution que pour les solutions de travail, comme décrit au paragraphe 15.

Application des produits chimiques d'essai et des témoins

17. Le milieu de culture ou les solutions de travail décrits aux paragraphes 15 et 16 sont mélangés en proportion 1:1 (v/v) avec les suspensions de cellules préparées dans la plaque microtitre 24 ou 96 puits à fond plat (voir paragraphe 12). Les plaques traitées sont ensuite placées en incubation pendant 24 ± 0,5 heures à 37 °C, 5 % CO_2. Des précautions doivent être prises contre l'évaporation des produits chimiques d'essai volatiles et pour éviter toute contamination croisée entre puits par les produits chimiques d'essai (en scellant la plaque avant incubation avec les produits chimiques d'essai, par exemple) (20).

▼**M8**

Coloration à l'iodure de propidium (IP)

18. Après 24 ± 0,5 heures d'exposition, les cellules sont transférées dans des tubes à essai et collectées par centrifugation. Les surnageants sont éliminés et le culot cellulaire est suspendu dans 200 µl (plaque 96 puits) ou 600 µL (plaque 24 puits) de tampon phosphate salin contenant 0,1 % d'albumine de sérum bovin (tampon de coloration). On transfère 200 µl de suspension de cellules dans une plaque microtitre 96 puits à fond rond (échantillons issus de la plaque 96 puits) ou dans un microtube (échantillons issus de la plaque 24 puits), puis les cellules sont rincées deux fois dans 200 µl (96 puits) ou 600 µl (24 puits) de tampon de coloration. Pour finir, les cellules sont remises en suspension dans le tampon de coloration (400 µl, par exemple) et on ajoute une solution d'IP (20 µl, par exemple) (pour obtenir, par exemple, une concentration finale d'IP de 0,625 µg/ml). D'autres marqueurs de cytotoxicité tels que la 7-aminoactinomycine D (7-AAD) ou le bleu de Trypan, entre autres, peuvent être utilisés comme colorants s'il est prouvé qu'ils génèrent des résultats comparables à l'IP, par exemple en testant les substances d'épreuve figurant à l'appendice 1-2.

Mesure de cytotoxicité par cytométrie en flux et estimation de la valeur CV75

19. Le niveau de fixation de l'IP est analysé par cytométrie en flux sur le canal FL-3. Au total, 10 000 cellules vivantes (IP-négatives) sont analysées. La viabilité cellulaire est calculée par le programme d'analyse du cytomètre suivant l'équation ci-après. Si la viabilité cellulaire est faible, il convient d'analyser jusqu'à 30 000 cellules, y compris des cellules mortes. Une autre option est d'acquérir les données pendant une minute après le début de l'analyse.

$$Viabilité\ cellulaire = \frac{Nombre\ de\ cellules\ vivantes}{Nombre\ total\ de\ cellules\ analysées} \times 100$$

La valeur CV75 (voir paragraphe 13), soit la concentration provoquant 25 % de cytotoxicité et 75 % de survie des cellules THP-1, est calculée par interpolation log-linéaire des données, comme suit:

$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

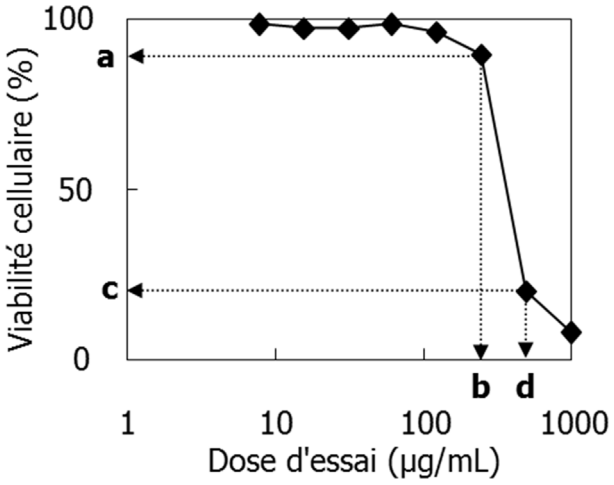
Où:

a est la valeur minimale de viabilité cellulaire supérieure à 75 %

c est la valeur maximale de viabilité cellulaire inférieure à 75 %

b et d sont les concentrations provoquant les valeurs de viabilité cellulaire a et c, respectivemen

▼**M8**



D'autres approches peuvent être utilisées pour calculer la valeur CV75 à condition qu'il soit démontré que cela n'a pas d'impact sur les résultats (par exemple en testant les substances d'épreuve).

Mesure de l'expression de CD86/CD54

Préparation des produits chimiques d'essai et des témoins

20. Le solvant/véhicule approprié (solution saline, milieu ou DMSO, voir paragraphe 14) est utilisé pour dissoudre les produits chimiques d'essai ou pour créer une dispersion stable. Les produits chimiques d'essai sont d'abord dilués jusqu'à une concentration correspondant à 100 fois (dans la solution saline ou le milieu) ou 500 fois (dans le DMSO) la valeur CV75 x 1,2 telle que déterminée dans l'*essai de détermination de la dose* (voir paragraphe 19). Si la valeur CV75 ne peut pas être établie (c'est-à-dire, si la cytotoxicité observée dans l'*essai de détermination de la dose* est insuffisante), il convient d'utiliser comme concentration de départ la concentration soluble ou en dispersion stable la plus élevée du produit chimique d'essai préparé avec chaque solvant/véhicule. On notera que la concentration finale dans la plaque microtitre ne doit pas dépasser 5 000 µg/ml (dans la solution saline ou le milieu) ou 1 000 µg/ml (dans le DMSO). Ensuite, des dilutions en série de facteur 1,2 sont réalisées avec le solvant/véhicule pertinent pour obtenir les solutions mères (huit concentrations allant de 100×1,2 × CV75 à 100×0,335 × CV75 (dans la solution saline ou le milieu) ou de 500×1,2 × CV75 à 500×0,335 × CV75 (pour le DMSO)) qui seront testées suivant la méthode h-CLAT (voir le protocole DB-ALM n° 158 pour un exemple de schéma de dosage). Les solutions mères sont ensuite diluées à nouveau par un facteur de 50 (solution saline ou milieu) ou 250 (DMSO) dans le milieu de culture (solutions de travail). Ces solutions de travail sont enfin utilisées pour l'exposition, après une dilution finale de facteur 2 dans la plaque microtitre. Si les résultats ne rentrent pas dans les critères d'acceptabilité pour la viabilité cellulaire décrits aux paragraphes 29 et 30, l'*essai de détermination de la dose* peut être répété pour déduire une valeur CV75 plus précise. Il convient de noter que seules des plaques 24 puits peuvent être utilisées pour la mesure de l'expression de CD86/CD54.

21. Le témoin de solvant/véhicule est préparé comme indiqué au paragraphe 16. Le témoin positif utilisé dans la méthode h-CLAT est le DNCB (voir paragraphe 11), dont des solutions mères sont préparées dans le DMSO et diluées comme pour les solutions mères au paragraphe 20. Le DNCB doit être utilisé comme témoin positif pour la *mesure de l'expression de CD86/CD54* à une concentration finale unique dans la plaque (en général 4,0 µg/ml). Pour obtenir une concentration de 4,0 µg/ml de DNCB dans la plaque microtitre, une solution de base de 2 mg/ml de DNCB dans le DMSO est préparée puis

▼M8

diluée à nouveau par un facteur de 250 dans le milieu, jusqu'à obtenir une solution de travail à 8 µg/ml. Il est aussi possible de prendre la valeur CV75 du DNCB, déterminée dans chaque installation d'essai, comme concentration du témoin positif. D'autres témoins positifs adaptés peuvent être utilisés si des données historiques sont disponibles pour en dériver des critères d'acceptabilité comparables pour les épreuves. Pour les témoins positifs, la concentration finale unique dans la plaque ne doit pas dépasser 5 000 µg/mL (solution saline ou milieu) ou 1 000 µg/mL (DMSO). Les critères d'acceptabilité de l'épreuve sont identiques à ceux décrits pour les produits chimiques d'essai (voir paragraphe 29), sauf le dernier critère d'acceptabilité puisque le témoin positif est traité à une concentration unique.

Application des produits chimiques d'essai et des témoins

22. Une expérience par produit chimique d'essai et par substance témoin est nécessaire pour obtenir une prédiction. Chaque expérience consiste en au moins deux épreuves indépendantes visant à *mesurer l'expression de CD86/CD54* (voir paragraphes 26-28). Les épreuves indépendantes se déroulent des jours distincts, ou le même jour en respectant les conditions suivantes pour chaque épreuve: a) préparation de solutions mères et de travail fraîches, indépendantes, du produit chimique et des solutions d'anticorps, et b) utilisation de cellules récoltées en deux temps indépendants (provenant de flacons de culture différents); les cellules peuvent cependant être issues d'un même repiquage. Les solutions de travail des produits chimiques d'essai et des substances témoins (500 µl) sont mélangées à 500 µl de la suspension de cellules ($1x10^6$ cellules) suivant un ratio 1:1. Les cellules sont incubées pendant 24 ± 0,5 heures comme décrit aux paragraphes 20 et 21. Pour chaque épreuve, un seul réplicat par concentration du produit chimique d'essai et de la substance témoin suffit, car la prédiction provient d'au moins deux épreuves indépendantes.

Coloration cellulaire et analyse

23. Après 24±0,5 heures d'exposition, les cellules sont transférées de la plaque 24 puits vers des tubes à essai et collectées par centrifugation, avant d'être lavées deux fois avec 1ml de tampon de coloration (si nécessaire, des étapes de lavage supplémentaires peuvent être faites). Après lavage, les cellules sont saturées avec 600 µl de solution de blocage (tampon de coloration contenant 0,01 % (m/v) de globuline (fraction Cohn II, III, humain: SIGMA, #G2388-10G)) et incubées à 4°C pendant 15 minutes. Après la saturation, les cellules sont réparties en trois aliquotes de 180 µL, dans une plaque 96 puits à fond rond ou dans un microtube.

24. Après centrifugation, les cellules sont colorées à 4°C pendant 30 minutes, avec 50 µl d'anticorps marqués au FITC: anti-CD86 ou anti-CD54, ou anticorps murins isotype IgG1. Les anticorps, décrits dans le protocole n° 158 (h-CLAT) de la base de données DB-ALM (18), sont dilués dans du tampon de coloration selon un ratio de 3:25 v/v [pour CD86 (BD-Pharmingen, #555657; Clone: Fun-1)] ou 3:50 v/v [pour CD54 (DAKO, #F7143; Clone: 6.5B5) et IgG1 (DAKO, #X0927)]. Ces ratios de dilution des anticorps ont été identifiés au moment de la mise au point del'essai comme ceux présentant le meilleur rapport signal/bruit. L'expérience acquise lors de la mise au point de lessai indique que l'intensité de la fluorescence des anticorps est généralement comparable d'un lot à un autre. Cependant, les utilisateurs peuvent souhaiter procéder au titrage des anticorps dans leurs conditions de laboratoire, afin de déterminer la concentration la mieux adaptée. Des anticorps anti-CD86 et/ou anti-CD54 marqués par d'autres fluorochromes peuvent être utilisés s'il est prouvé qu'ils génèrent des résultats comparables aux anticorps marqués au FITC, par exemple en testant les substances d'épreuve figurant à l'appendice 1.2. Il convient de noter qu'un changement de clone ou de fournisseur d'anticorps, comme décrit dans le

▼M8

protocole n° 158 (h-CLAT) de la base de données DB-ALM (18), peut avoir un impact sur les résultats. Après avoir été lavées deux fois ou plus dans 150 µl de tampon de coloration, les cellules sont remises en suspension dans du tampon de coloration (p.ex. 400 µl) et on ajoute la solution d'IP (p.ex. 20 µl, pour une concentration finale de 0,625 µg/ml) ou un autre marqueur de cytotoxicité (voir paragraphe 18). Le niveau d'expression de CD86 et CD54, ainsi que la viabilité cellulaire, sont analysés par cytométrie en flux.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation des données

25. Le niveau d'expression de CD86 et CD54 est analysé par cytométrie en flux sur le canal FL-1. En fonction de la moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence (IMF, intensité moyenne de fluorescence), l'intensité relative de fluorescence (IRF) de CD86 et de CD54 pour les cellules témoins (ctrl) positives et pour les cellules exposées au produit chimique est calculée comme suit:

$$RFI = \frac{IMF\ cellules\ exposées\ au\ produit\ chimique - IMF\ témoins\ isotypes\ exposés\ au\ produit\ chimique}{IMF\ témoins\ exposés\ au\ solvant/véhicule - IMF\ témoins\ isotypes\ exposés\ au\ solvant/véhicule} \times 100$$

La viabilité cellulaire des cellules témoins isotypes, colorées avec les anticorps murins IgG1 (isotypes) est aussi calculée, suivant l'équation indiquée au paragraphe 19.

Modèle prédictif

26. . Pour la *mesure de l'expression de CD86/CD54*, on teste chaque produit chimique d'essai dans au moins deux épreuves indépendantes pour en déduire une prédiction unique (POSITIVE ou NÉGATIVE). Une prédiction par h-CLAT est jugée POSITIVE si l'une au moins des conditions suivantes se réalise dans deux sur deux ou au moins deux sur trois épreuves indépendantes; dans le cas contraire, la prédiction est jugée NÉGATIVE (figure 1):

— IRF de CD86 ≥ 150 % à toutes les concentrations testées (et viabilité cellulaire ≥ 50 %);

— IRF de CD54 ≥ 200 % à toutes les concentrations testées (et viabilité cellulaire ≥ 50 %).

27. En se basant sur les critères ci-dessus, si les deux premières épreuves sont toutes deux positives pour CD86 et/ou toutes deux positives pour CD54, la prédiction par h-CLAT est jugée POSITIVE et il n'est pas nécessaire de réaliser une troisième épreuve. De même, si les deux premières épreuves sont toutes deux négatives pour les deux marqueurs, la prédiction par h-CLAT est jugée NÉGATIVE (compte tenu des dispositions prévues au paragraphe 30) et il n'est pas nécessaire de réaliser une troisième épreuve. Cependant, si les deux premières épreuves ne sont pas concordantes pour l'un des marqueurs au moins (CD54 ou CD86), il est nécessaire de réaliser une troisième épreuve et la prédiction sera fondée sur le résultat obtenu dans la majorité des trois épreuves individuelles (c'est-à-dire 2 sur 3). À ce sujet, on notera que, si deux épreuves indépendantes sont menées et que l'une n'est positive que pour CD86 (ci-après P_1) tandis que l'autre n'est positive que pour CD54 (ci-après P_2), il est nécessaire de réaliser une troisième épreuve. Si la troisième épreuve est négative pour les deux marqueurs (ci-après N), la prédiction par h-CLAT est jugée NÉGATIVE. À l'inverse, si la troisième épreuve est positive pour l'un des marqueurs (P_1 ou P_2) ou pour les deux marqueurs (ci-après P_{12}), la prédiction par h-CLAT est jugée POSITIVE.

▼**M8**

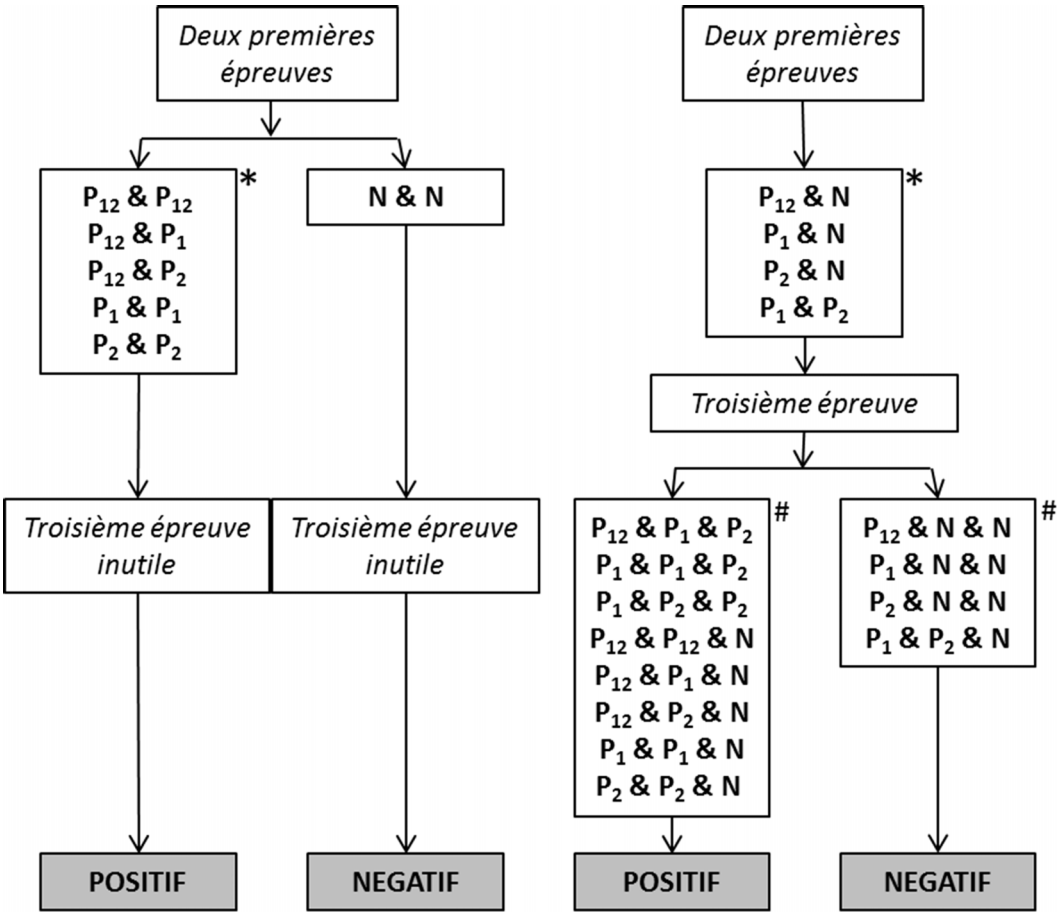


Figure 1: modèle prédictif utilisé dans l'essai h-CLAT. Une prédiction par h-CLAT doit être considérée dans le cadre d'une approche intégrée IATA et conformément aux dispositions des paragraphes 7 et 8 de l'Introduction Générale.

$P_{1:}$ épreuve positive pour CD86 seul; $P_{2:}$ épreuve positive pour CD54 seul; $P_{12:}$ épreuve positive pour CD86 et CD54; N: l'épreuve n'est positive ni pour CD86, ni pour CD54.

[*] Les cases montrent les combinaisons pertinentes de résultats issus des deux premières épreuves, indépendamment de l'ordre d'obtention des résultats.

[#] Les cases montrent les combinaisons pertinentes de résultats issus des trois épreuves sur la base des résultats obtenus dans les deux premières épreuves (cases au-dessus), mais ne reflètent pas l'ordre d'obtention des résultats.

28. Éventuellement, pour les produits chimiques d'essai assortis d'une prédiction par h-CLAT POSITIVE, deux valeurs de concentration efficace (CE), CE150 pour CD86 et CE200 pour CD54, peuvent être déterminées (c'est-à-dire la concentration à laquelle les produits chimiques d'essai génèrent une IRF de 150 ou 200). Ces valeurs de CE pourraient contribuer à l'évaluation de la puissance de sensibilisation (9), dans le cadre d'une approche intégrée IATA (4) (5) (6) (7) (8). Elles sont calculées à l'aide des équations ci-dessous:

▼**M8**

$$CE150\ (pour\ CD86) = B_{concentration} + [(150 - B_{IRF}) / (A_{IRF} - B_{IRF}) \times (A_{concentration} - B_{concentration})]$$

$$CE200\ (pour\ CD54) = B_{concentration} + [(200 - B_{IRF}) / (A_{IRF} - B_{IRF}) \times (A_{concentration} - B_{concentration})]$$

où

$A_{concentration}$ est la plus faible concentration en µg/ml générant une IRF > 150 (CD86) ou 200 (CD54)

$B_{concentration}$ est la plus forte concentration en µg/ml générant une IRF < 150 (CD86) ou 200 (CD54)

A_{IRF} est l'IRF à la plus faible concentration générant une IRF > 150 (CD86) ou 200 (CD54)

B_{IRF} est l'IRF à la plus forte concentration générant une IRF < 150 (CD86) ou 200 (CD54)

Afin de déterminer avec plus de précision les valeurs CE150 et CE200, trois épreuves indépendantes de *mesure de l'expression de CD86/CD54* peuvent être nécessaires. Les valeurs CE150 et CE200 finales sont alors définies comme la valeur médiane des CE calculées à partir des trois épreuves indépendantes. Si seules deux épreuves indépendantes sur trois satisfont aux critères de positivité (voir paragraphes 26-27), la valeur CE150 ou CE200 la plus élevée des deux est retenue.

Critères d'acceptabilité

29. Les critères d'acceptabilité suivants doivent être remplis lors de la mise en œuvre de la méthode h-CLAT (22) (27).

— les valeurs de viabilité cellulaire du témoin dans le milieu et du témoin de solvant/véhicule sont supérieures à 90 %.

— pour le témoin de solvant/véhicule, les IRF de CD86 et de CD54 ne dépassent pas les critères de positivité (CD86 IRF ≥ 150 % et CD54 IRF ≥ 200 %). Les valeurs d'IRF pour le témoin de solvant/véhicule sont calculées suivant la formule indiquée au paragraphe 25 (en remplaçant la mention «IMF du produit chimique» par «IMF du solvant/véhicule» et «IMF du solvant/véhicule» par «IMF du témoin (dans le milieu)»).

— pour les deux témoins (milieu et solvant/véhicule), les ratios IMF CD86/témoin isotype et IMF CD54/témoin isotype sont > 105 % dans les deux cas.

— pour le témoin positif (DNCB), les IRF de CD86 et de CD54 satisfont aux critères de positivité (CD86 IRF ≥ 150 % et CD54 IRF ≥ 200 %), avec une viabilité cellulaire > 50 %

— pour le produit chimique d'essai, la viabilité cellulaire est > 50 % pour au moins quatre concentrations testées dans chaque épreuve.

30. Un résultat négatif n'est acceptable que pour les produits chimiques d'essai présentant une viabilité cellulaire inférieure à 90 % à la plus haute concentration testée (soit 1,2 × CV75, selon le schéma de dilutions en série décrit au paragraphe 20). Si la viabilité à 1,2 × CV75 est égale ou supérieure à 90 %, le résultat négatif n'est pas pris en compte. Dans ce cas, il est recommandé d'essayer d'affiner le choix des doses en répétant la détermination de CV75. Il convient de noter que, si une concentration de 5 000 µg/ml dans la solution saline (ou dans le milieu ou autres solvants/véhicules), une concentration de 1 000 µg/ml dans le DMSO, ou la concentration soluble la plus élevée est utilisée comme concentration maximale d'essai pour un produit chimique, un résultat négatif est acceptable même en présence d'une viabilité cellulaire supérieure à 90 %.

▼M8

Rapport d'essai

31. Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes.

Produit chimique d'essai

Substance mono-constituant

— identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants;

— apparence physique, Log Koe, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques, selon les données disponibles;

— pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;

— traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);

— concentration(s) testée(s);

— conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;

— justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai.

Substance multi-constituants, UVCB ou mélange

— caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;

— apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;

— masse moléculaire ou masse moléculaire apparente dans le cas de mélanges/polymères de composition connue ou autres informations pertinentes pour la conduite de l'étude;

— traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);

— concentration(s) testée(s);

— conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;

— justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai.

Témoins

Témoin positif

— identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants;

— apparence physique, Log Koe, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;

— pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;

▼**M8**

— traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);

— concentration(s) testée(s);

— conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;

— référence aux données historiques relatives aux témoins positifs démontrant la conformité aux critères d'acceptabilité, s'il y a lieu.

Témoin négatif et témoin de solvant/véhicule

— identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants;

— pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;

— apparence physique, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, si des solvants/véhicules autres que ceux mentionnés dans la Ligne directrice sont utilisés, et selon les données disponibles;

— conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;

— justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai.

Conditions d'essai

— nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude;

— description de l'essai utilisé;

— lignée cellulaire utilisée, conditions de stockage et source (établissement d'où proviennent les cellules, par exemple);

— type de cytométrie en flux utilisé (modèle, par exemple), en particulier paramétrage des instruments, globuline, anticorps et marqueur de cytotoxicité utilisés;

— procédure appliquée pour démontrer les compétences du laboratoire dans l'exécution de l'essai au moyen des substances d'épreuve de compétence et procédure appliquée pour démontrer la reproductibilité de l'essai dans le temps, par exemple données historiques des témoins et/ou des contrôles de réactivité.

Critères d'acceptabilité de l'essai

— viabilité cellulaire, valeurs IMF et IRF avec le témoin de solvant/véhicule comparées à la plage d'acceptabilité;

— viabilité cellulaire et valeurs IRF avec le témoin positif comparées à la plage d'acceptabilité;

— viabilité cellulaire de toutes les concentrations testées du produit chimique d'essai.

▼**M8**

Mode opératoire

— nombre d'épreuves réalisées;

— concentration de produit chimique d'essai, application et durée d'exposition (si différente de la durée recommandée);

— description des critères d'évaluation et de décision appliqués;

— description de toutes modifications apportées au mode opératoire.

Résultats

— tableau des données, y compris CV75 (s'il y a lieu), IMF géométrique, IRF, valeurs de viabilité cellulaire, valeurs CE150/CE200 (s'il y a lieu) pour chaque produit chimique testé et substance témoin dans chaque épreuve, et indication de la classification du produit chimique d'essai d'après le modèle prédictif;

— description de toutes autres observations pertinentes, s'il y a lieu.

Discussion des résultats

— discussion des résultats obtenus par la méthode h-CLAT;

— examen des résultats de l'essai dans le contexte d'une démarche intégrée (IATA), si d'autres informations pertinentes sont disponibles.

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

(1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. Toxicol. *In Vitro* 20, 767–773.

(2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. Toxicol. *In Vitro* 21, 428-437.

(3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Disponible à l'adresse suivante: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. J Appl Toxicol. 35, 1318-1332.

(5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. J Appl Toxicol. 35, 1333-1347.

(6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potencials. Regul Toxicol Parmacol. 63, 489-504.

▼**M8**

(7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol. 69, 371-379.

(8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Parmacol. 71, 337-351.

(9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. Arch Toxicol. 89, 2355-2383.

(10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. J Appl Toxicol. DOI 10.1002/jat.3281.

(11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. Toxicol. *In Vitro* 26, 1150-60.

(12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Disponible à l'adresse suivante: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing

(13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Disponible à l'adresse suivante: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. J. Toxicol. Sci. 38, 599-609.

(15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch Toxicol 87, 1683-1969.

(17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6^{th} report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.

(18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Disponible à l'adresse suivante: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

▼**M8**

(19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamato K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.

(20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.

(21) OCDE (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Série de l'OCDE sur les essais et évaluations. Organisation de coopération et de développement économiques, , Paris, France, 2005, 96 pp.

(22) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Série sur les essais et évaluations No 168. Disponible à l'adresse suivante: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(201210/PART1&docLanguage=En)

(23) Organisation des Nations unies (2013). Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). Cinquième édition révisée. New York & Genève: Publications des Nations unies. ISBN: 978-92-1-216531-8. Disponible à l'adresse suivante: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_f.html

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).

(25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

▼**M8**

Appendice 1.1

DÉFINITIONS

Précision: étroitesse de l'accord entre les résultats de l'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de l'essai et l'un des aspects de sa «pertinence». Ce terme est souvent utilisé au sens de «concordance», pour qualifier la proportion de résultats corrects d'un essai (21).

AOP (*Adverse Outcome Pathway*, voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables): séquence d'événements conduisant à la survenue d'un effet indésirable *in vivo*, à partir de la structure chimique d'un produit chimique cible ou d'un groupe de produits chimiques analogues et de l'événement initiateur au niveau moléculaire (22).

Produit chimique: une substance ou un mélange.

CV75: concentration estimée générant une viabilité cellulaire de 75 %.

CE150: concentrations générant des IRF de 150 pour l'expression de CD86.

CE200: concentrations générant des IRF de 200 pour l'expression de CD54.

Cytométrie en flux: technique de cytométrie dans laquelle des cellules en suspension dans un fluide passent une par une dans un faisceau d'excitation lumineuse, le schéma de diffusion de la lumière étant caractéristique des cellules et de leurs composants; les cellules sont souvent marquées avec des marqueurs fluorescents pour que la lumière soit d'abord absorbée puis émise à nouveau à une autre fréquence.

Danger: propriété intrinsèque d'un agent ou situation susceptible de provoquer des effets indésirables lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-) population est exposé(e) à cet agent.

IATA (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*, approches intégrées en matière d'essais et d'évaluation): approche structurée utilisée dans l'identification du danger (potentiel), la caractérisation du danger (puissance) et/ou dans l'évaluation de la sécurité (potentiel de danger/puissance du danger et exposition) d'un produit chimique ou d'un groupe de produits chimiques, qui intègre de façon stratégique et pondérée toutes les données pertinentes dans le but d'informer une décision réglementaire sur le danger potentiel et/ou le risque et/ou le besoin d'effectuer d'autres tests ciblés.

Témoin avec milieu: réplicat non traité contenant tous les composants d'un système d'essai. Cet échantillon subit les mêmes procédures que les échantillons témoins traités ou non avec le produit chimique d'essai afin de déterminer si le solvant/véhicule interagit avec le système d'essai.

Mélange: mélange ou solution constitué(e) d'au moins deux substances.

Substance mono-constituant: substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un constituant principal est présent à hauteur de 80 % minimum (m/m).

Substance multi-constituants: substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant principal est présent dans une concentration ≥ 10 % (m/m) et < 80 % (m/m). Une substance multi-constituants résulte d'un processus de fabrication. La différence entre un mélange et une substance multi-constituants est qu'un mélange est obtenu en associant deux substances ou plus sans qu'il se produise de réaction chimique. Une substance multi-constituants est le résultat d'une réaction chimique.

▼M8

Témoin positif: réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec une substance connue pour induire une réponse positive. Pour qu'il soit possible d'évaluer la variabilité dans le temps de la réponse du témoin positif, l'intensité maximale de celle-ci ne doit pas être excessive.

Pré-haptènes: produits chimiques devenant sensibilisants suite à une transformation abiotique.

Pro-haptènes: produits chimiques acquérant un potentiel de sensibilisation cutanée suite à une activation enzymatique.

Intensité relative de fluorescence (IRF): valeur relative de la moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence (IMF) des cellules exposées au produit chimique comparée à l'IMF des cellules exposées au solvant/véhicule.

Pertinence: décrit la relation entre l'essai et l'effet étudié, et rend compte de l'adéquation de l'essai et de son utilité à des fins spécifiques. La pertinence indique dans quelle mesure l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. Elle tient compte de la précision (concordance) de l' essai (21).

Fiabilité: indique dans quelle mesure la mise en œuvre d'un essai peut être reproduite au cours du temps par un même laboratoire ou plusieurs laboratoires utilisant le même mode opératoire. Pour l'évaluer, on calcule la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires et la répétabilité intra-laboratoire (21).

Épreuve: consiste à tester un ou plusieurs produits chimiques parallèlement à un solvant/véhicule et à un témoin positif.

Sensibilité: proportion des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'un essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence de l'essai (21).

Tampon de coloration: tampon phosphate salin contenant 0,1 % albumine de sérum bovin.

Témoin de solvant/véhicule: échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, excepté le produit chimique d'essai, mais comprenant le solvant/véhicule utilisé. Il sert à déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique d'essai dissous ou en dispersion stable dans le même solvant/véhicule. Testé simultanément avec un témoin avec milieu, cet échantillon indique également si le solvant/véhicule interagit avec le système d'essai.

Spécificité: proportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'un essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence de l'essai (21).

Substance: élément chimique et ses composés à l'état naturel ou obtenus par un procédé de production, y compris tout additif nécessaire pour préserver leur stabilité ainsi que toute impureté produite par le procédé utilisé, mais à l'exclusion de tout solvant pouvant être extrait sans affecter la stabilité de la substance ni modifier sa composition.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode.

▼**M8**

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations unies): système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans l'objectif de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (23).

UVCB: substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques.

Essai valide: essai dont la pertinence et la fiabilité sont jugées satisfaisantes pour des fins spécifiques, et qui repose sur des principes scientifiquement valables. Un essai n'est jamais valide dans l'absolu, mais seulement par rapport à une fin particulière (21).

▼**M8**

Appendice 1.2

SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE

Avant d'utiliser en routine l'essai décrit dans le présent appendice à la méthode d'essai B.71, les laboratoires doivent démontrer leurs compétences techniques en obtenant la prédiction attendue avec la méthode h-CLAT pour les 10 substances recommandées au tableau 1 et en obtenant des valeurs CV75, CE150 et CE200 compatibles avec les plages de référence respectives d'au moins 8 substances d'épreuve sur 10. Ces substances ont été sélectionnées de façon à représenter la gamme des réponses possibles en ce qui concerne les dangers de sensibilisation cutanée. Les autres critères de sélection étaient la disponibilité des substances dans le commerce, ainsi que la disponibilité de données de référence de grande qualité *in vivo* et *in vitro* générées avec la méthode h-CLAT. Des données de référence publiées pour la méthode h-CLAT sont par ailleurs disponibles (3) (14).

Tableau 1

Substances recommandées pour démontrer les compétences techniques relatives à la méthode h-CLAT

Substances d'épreuve de compétence	N° CAS	État physique	Prédiction *in vivo* (1)	CV75 plage de reference en µg/ml (2)	Résultats h-CLAT pour CD86 (CE150 plage de référence en µg/ml) (2)	Résultats h-CLAT pour CD54 (C200 plage de référence en µg/ml) (2)
2,4-Dinitrochlorobenzène	97-00-7	Solide	Sensibilisant (extrême)	2-12	Positive (0.5-10)	Positive (0.5-15)
4-Phénylènediamine	106-50-3	Solide	Sensibilisant (fort)	5-95	Positive (< 40)	Négative (> 1.5) (3)
Sulfate de nickel	10101-97-0	Solide	Sensibilisant (modéré)	30-500	Positive (< 100)	Positive (10-100)
Mercapto-2-benzothiazole	149-30-4	Solide	Sensibilisant (modéré)	30-400	Négative (> 10) (3)	Positive (10-140)
R(+)-Limonène	5989-27-5	Liquide	Sensibilisant (faible)	> 20	Négative (> 5) (3)	Positive (< 250)
Imidazolidinyl urée	39236-46-9	Solide	Sensibilisant (faible)	25-100	Positive (20-90)	Positive (20-75)
Isopropanol	67-63-0	Liquide	Non-Sensibilisant	> 5 000	Négative (> 5 000)	Négative (> 5 000)
Glycérol	56-81-5	Liquide	Non-Sensibilisant	> 5 000	Négative (> 5 000)	Négative (> 5 000)
Acide lactique	50-21-5	Liquide	Non-Sensibilisant	1500-5 000	Négative (> 5 000)	Négative (> 5 000)
Acide 4-aminobenzoïque	150-13-0	Solide	Non-Sensibilisant	>1 000	Négative (> 1 000)	Négative (> 1 000)

Abréviations: N° CAS = Numéro d'enregistrement au *Chemical Abstracts Service*

(1) Prédiction de danger (et de puissance) *in vivo* d'après les données ELGL (3) (14). La puissance *in vivo* est déterminée d'après les critères proposés par l'ECETOC (24).

(2) Basée sur les valeurs historiques observées (13) (25).

(3) Historiquement, la majorité des résultats obtenus pour ce marqueur étaient négatifs, on attend donc un résultat le plus souvent négatif. La plage indiquée a été définie sur la base des quelques résultats positifs historiques. En cas de résultat positif, la valeur EC doit être comprise dans la plage de référence indiquée.

▼**M8**

Appendice 2

SENSIBILISATION CUTANÉE *IN VITRO*: TEST D'ACTIVATION DE LA LIGNÉE CELLULAIRE U937 (U-SENS™)

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

1. L'essai U-SENS™ permet de quantifier les variations d'expression des marqueurs cellulaires de surface associés au processus d'activation des monocytes et des DC (i.e. CD86), dans la lignée cellulaire de lymphome histiocytaire humain U937, à la suite de l'exposition à des sensibilisants (1). Le niveau d'expression mesuré pour le marqueur de surface CD86 dans la lignée cellulaire U937 peut alors apporter une aide pour distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés.

2. L'essai U-SENS™ a fait l'objet d'une étude de validation (2) coordonnée par L'Oréal, suivie d'un examen indépendant par des pairs sous la conduite du Comité scientifique consultatif (ESAC) du Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les méthodes de substitution à l'expérimentation animale (EURL ECVAM) (3). Après analyse des preuves disponibles et sur avis des organismes de régulation et des parties prenantes, l'EURL ECVAM a recommandé l'utilisation de la méthode U-SENS™ (4) dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA, pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants à des fins de classification et d'étiquetage des dangers. Dans son Guide relatif à la production de rapports sur les approches structurées d'intégration des données et d'utilisation de sources individuelles d'information dans le cadre d'une approche IATA pour la sensibilisation cutanée, l'OCDE analyse actuellement plusieurs études de cas décrivant diverses stratégies d'essai et différents modèles prédictifs. L'une des approches définies repose sur l'essai U-SENS (5). On trouvera dans la littérature (4), (5) (7) des exemples d'utilisation des données U-SENS™ combinées à d'autres sources d'information, y compris des données historiques et des données humaines valides pré-existantes (6).

3. Il a été démontré que l'essai U-SENS™ est transférable à des laboratoires expérimentés dans le domaine des cultures cellulaires et de l'analyse par cytométrie en flux. Le niveau de reproductibilité attendu des prédictions faites par l'essai est de l'ordre de 90 % intra-laboratoire et 84 % inter-laboratoires (8). L'étude de validation (8) et d'autres études publiées (1) ont permis de conclure que, comparé aux résultats obtenus par la méthode ELGL, la précision de distinction entre sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH/CLP) et non-sensibilisants est de 86 % (N = 166), la sensibilité est de 91 % (118/129) et la spécificité est de 65 % (24/37). En comparaison avec les résultats obtenus chez l'humain, la précision de distinction entre sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH/CLP) et non-sensibilisants est de 77 % (N = 101), la sensibilité est de 100 % (58/58) et la spécificité est de 47 % (20/43). En comparaison avec la méthode ELGL, il est probable que les faux-négatifs dans les prédictions effectuées avec la méthode U-SENS™ concernent plus de produits chimiques ayant une puissance de sensibilisation de la peau faible à modérée (c'est-à-dire sous-catégorie 1B du SGH/CLP) que de produits chimiques ayant une puissance de sensibilisation de la peau élevée (c'est-à-dire sous-catégorie 1A du SGH/CLP) (1) (8) (9). L'ensemble de ces données montre l'utilité de l'essai U-SENS™ comme élément contribuant à l'identification des dangers de sensibilisation cutanée. Cependant, les valeurs relatives à la précision de l'essai U-SENS™ utilisé seul n'ont qu'un caractère indicatif, car cet essai doit être combiné à d'autres sources d'information dans le contexte d'une démarche IATA, et conformément aux dispositions énoncées aux paragraphes 7 et 8 et à l'Introduction. Au demeurant, dans l'évaluation des méthodes d'étude de la sensibilisation cutanée sans expérimentation animale, il convient de tenir compte du fait que l'ELGL et les autres méthodes d'expérimentation animale ne reflètent peut-être pas parfaitement la situation chez l'espèce d'intérêt, à savoir l'être humain.

▼**M8**

4. Les données actuellement disponibles montrent que l'essai U-SENS™ est applicable à des produits chimiques (y compris des ingrédients cosmétiques tels que conservateurs, surfactants, substances actives, colorants) couvrant divers groupes fonctionnels organiques, propriétés physico-chimiques, puissances de sensibilisation cutanée (telles qu'établies par des études *in vivo*) et l'ensemble des mécanismes de réaction connus associés à la sensibilisation cutanée (i.e., accepteur de Michael, synthèse d'une base de Schiff, agent acylant, substitution nucléophile bimoléculaire [SN2] ou substitution nucléophile aromatique [SNAr]) (1) (8) (9) (10). L'essai U-SENS™ est applicable aux produits chimiques solubles ou formant une dispersion stable (colloïde ou suspension dans laquelle le produit chimique d'essai ne se dépose pas et ne se sépare pas du solvant/véhicule en formant plusieurs phases) dans un solvant/véhicule adapté (voir paragraphe 13). Les produits chimiques de la base de données signalés comme des pré-haptènes (substances activées par oxydation) ou des pro-haptènes (substances nécessitant une activation enzymatique, par exemple via des enzymes P450) ont été correctement identifiés par l'essai U-SENS™ (1) (10). Les substances pouvant conduire à la rupture de la membrane peuvent générer des faux-positifs dus à une augmentation non spécifique de l'expression de CD86.En effet, 3/7 faux-positifs comparés à la classification de référence *in vivo* étaient des surfactants (1). Pour cette raison, les résultats positifs avec les surfactants doivent être traités avec précaution, tandis que les résultats négatifs avec les surfactants peuvent être utilisés pour étayer l'identification du produit chimique d'essai comme non-sensibilisant. Il est possible de tester des produits chimiques fluorescents avec l'essai U-SENS™ (1), cependant les produits fortement fluorescents qui émettent dans la même longueur d'onde que l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou que l'iodure de propidium (IP) causent une interférence avec la détection par cytométrie en flux. Ces produits ne peuvent donc pas être adéquatement analysés avec des anticorps conjugués au FITC (risque de faux-négatif) ou à l'IP (viabilité non mesurable). Dans ce cas, on peut recourir respectivement au marquage des anticorps par d'autres fluorochromes, ou à d'autres marqueurs de cytotoxicité, respectivement, à condition qu'il soit démontré, p.ex. en testant les substances d'épreuve de compétence citées à l'appendice 2.2, que ces techniques génèrent des résultats similaires aux anticorps marqués au FITC ou à l'IP (voir paragraphe 18). À la lumière de ce qui précède, les résultats positifs avec les surfactants et les résultats négatifs avec des produits chimiques fortement fluorescents devront être interprétés dans le contexte des limites indiquées et combinés avec d'autres sources d'information dans le cadre d'une démarche IATA. S'il est démontré que l'essai U-SENS™ n'est pas applicable à d'autres catégories spécifiques de produits chimiques d'essai, cet essai ne doit pas leur être appliqué.

5. Comme indiqué ci-dessus, l'essai U-SENS™ aide à distinguer les sensibilisants cutanés des non-sensibilisants. Cependant, utilisée dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA, elle peut aussi contribuer à l'évaluation de la puissance de sensibilisation. Des travaux complémentaires, s'appuyant de préférence sur des données humaines, seront toutefois nécessaires pour déterminer de quelle façon les résultats de l'essai U-SENS™ pourraient venir à l'appui de ce type d'évaluation.

6. Les définitions sont fournies à l'Appendice 2.1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. L'essai U-SENS™ est un essai *in vitro* qui permet de quantifier les variations d'expression du marqueur de surface CD86 des cellules de la lignée cellulaire de lymphome histiocytaire humain (cellules U937) après une exposition de 45 ± 3 heures à un produit chimique d'essai. Le marqueur de surface CD86 est typique de l'activation des cellules U937. Il s'agit d'une molécule de costimulation connue pour simuler l'activation monocytaire, étape critique dans l'amorçage des lymphocytes T. La variation d'expression du marqueur de surface CD86 est mesurée par cytométrie en flux après coloration cellulaire avec des anticorps marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). La cytotoxicité est mesurée en parallèle (en utilisant l'IP, par exemple) pour

▼M8

savoir si la surexpression du marqueur de surface CD86 a lieu à des concentrations inférieures au niveau de cytotoxicité. L'indice de stimulation du marqueur de surface CD86, comparé à celui du témoin de solvant/véhicule, est calculé et inséré dans un modèle prédictif (voir paragraphe 19), pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants.

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

8. Avant d'utiliser en routine l'essai décrit dans le présent appendice à la méthode d'essai B.71, les laboratoires devront faire la preuve de leurs compétences techniques, en appliquant la méthode aux dix substances d'épreuve listées à l'appendice 2.2, conformément aux Bonnes pratiques pour les méthodes *in vitro* (11). En outre, les utilisateurs de l'essai devront conserver une base de données historiques générées avec les vérifications de réactivité (voir paragraphe 11), avec le témoin positif et avec le témoin de solvant/véhicule (voir paragraphes 15-16), et devront utiliser ces données pour confirmer la reproductibilité à long terme de l'essai au sein de leur laboratoire.

PROCÉDURE

9. 1. Le présent essai est basé sur le protocole U-SENS™ n° 183 de la base de données sur les méthodes de substitution (DB-ALM) (12). Le mode opératoire normalisé doit être suivi lors de la mise en œuvre et de l'exécution de l'essai U-SENS™ en laboratoire. Un système automatisé d'utilisation du U-SENS™ peut être employé s'il est prouvé qu'il génère des résultats comparables, par exemple en testant les substances d'épreuve figurant à l'appendice 2.2. On trouvera dans ce qui suit une description des principaux éléments et modes opératoires pour l'essai U-SENS™.

Préparation des cellules

10. Il convient d'utiliser la lignée cellulaire de lymphome histiocytaire humain, U937 (13), pour mettre en œuvre l'essai U-SENS™. Les cellules (clone CRL1593.2) seront obtenues auprès d'une banque de cellules reconnue, par exemple l'*American Type Culture Collection*.

11. Les cellules U937 sont cultivées à 37 °C dans une atmosphère humide à 5 % CO_2, dans un milieu de culture RPMI-1640 supplémenté avec 10 % sérum de veau fœtal (SVF), 2 mM L-glutamine, 100 unités/ml pénicilline et 100 µg/ml streptomycine (milieu complet). Les cellules U937 sont repiquées régulièrement tous les 2 ou 3 jours à une densité de 1,5 ou 3×10^5 cellules/ml, respectivement. La densité cellulaire n'excède pas 2×10^6 cellules/ml et la viabilité cellulaire mesurée par l'exclusion du bleu de Trypan est ≥ 90 % (ce critère ne doit pas être appliqué au premier passage après décongélation). Avant utilisation pour l'essai, chaque lot de cellules, de SVF ou d'anticorps doit être qualifié par une vérification de réactivité. La vérification de réactivité des cellules est réalisée avec le témoin positif, l'acide picrylsulfonique (acide 2,4,6-trinitro-benzènesulfonique: TNBS) (N°CAS 2508-19-2, pureté ≥ 99 %) et avec le témoin positif, l'acide lactique (N°CAS 50-21-5, pureté ≥ 85 %) au moins une semaine après décongélation. La vérification de réactivité est réalisée avec six concentrations finales pour chacun des témoins (TNBS: 1; 12,5; 25; 50; 75; 100 µg/ml et acide lactique: 1; 10; 20; 50; 100; 200 µg/mL). Le TNBS dissous dans du milieu complet doit générer une réponse positive pour CD86 dépendante de la concentration (i.e. à partir d'une concentration donnant une réponse positive, I.S. CD86 ≥ 150, la concentration supérieure donne une I.S. CD86 croissante) et l'acide lactique dissous dans du milieu complet doit générer une réponse négative pour CD86 (voir paragraphe 21). Seuls les lots de cellules soumis avec succès et à deux reprises à la vérification de réactivité sont utilisés dans l'essai. Les cellules peuvent être repiquées jusqu'à sept semaines après décongélation. Un maximum de 21 repiquages est possible. La vérification de réactivité doit être réalisée suivant le protocole décrit aux paragraphes 18 à 22.

▼M8

12. Pour l'essai, les cellules U937 sont ensemencées à une densité de 3×10^5 cellules/ml ou de 6×10^5 cellules/ml, puis pré-cultivées dans des flacons de culture pendant 2 ou 1 jour(s), respectivement. D'autres conditions de pré-culture que celles indiquées ci-dessus peuvent être utilisées, à condition que les raisons scientifiques en soient expliquées et s'il est prouvé que ces conditions génèrent des résultats comparables, par exemple en testant les substances d'épreuve figurant à l'appendice 2.2. Le jour de l'essai, les cellules sont récoltées depuis le flacon de culture et suspendues à une densité de 5×10^5 cellules/ml dans un milieu frais. Les cellules sont ensuite ensemencées dans une plaque 96 puits à fond plat, à raison de 100 µl/puits (densité cellulaire finale $0{,}5 \times 10^5$ cellules/puits).

Préparation des produits chimiques d'essai et des témoins

13. L'évaluation de la solubilité est réalisée avant l'essai. À cet effet, les produits chimiques d'essai sont dissous ou dispersés de façon stable à une concentration de 50 mg/ml, en choisissant de préférence comme solvant/véhicule le milieu complet, ou, en deuxième option, le diméthylsulfoxyde (DMSO, pureté ≥ 99 %) si le produit chimique d'essai n'est pas soluble dans le milieu complet. Pour l'essai, la concentration finale du produit chimique d'essai est de 0,4 mg/ml en milieu complet si le produit chimique est soluble dans ce solvant/véhicule. Si le produit chimique n'est soluble que dans le DMSO, la concentration du produit chimique d'essai est de 50 mg/ml. Il est possible d'utiliser d'autres solvants/véhicules que ceux indiqués ci-dessus, à condition que les raisons scientifiques en soient expliquées. Il importe de tenir compte de la stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant/véhicule.

14. Les produits chimiques d'essai et les substances témoin sont préparés le jour de l'essai. Étant donné qu'aucun essai de détermination de la dose n'est mené, on testera, pour la première épreuve, six concentrations finales (1, 10, 20, 50, 100 et 200 µg/ml) dans le solvant/véhicule correspondant, soit du milieu complet, soit du DMSO à 0,4 % dans du milieu. Pour les épreuves suivantes, en partant de solutions de produits chimiques d'essai à une concentration de 0,4 mg/ml dans du milieu complet ou de 50 mg/ml dans du DMSO, au moins quatre solutions de travail (i.e. au moins quatre concentrations) sont préparées avec le solvant/véhicule correspondant. Pour finir, les solutions de travail sont utilisées pour le traitement en ajoutant un même volume de cellules U937 en suspension (voir paragraphe 11 ci-dessus) au volume de solution de travail dans la plaque, pour parvenir à une dilution supplémentaire de facteur 2 (12). Les concentrations (au moins quatre) pour toute épreuve supplémentaire sont choisies en fonction des résultats particuliers de toutes les épreuves précédentes (8). Les concentrations finales utilisables sont 1; 2; 3; 4; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 120; 140; 160; 180 et 200 µg/mL. La concentration finale maximale est 200 µg/ml. Si une valeur positive est obtenue pour CD86 à 1 µg/ml, il convient de tester à 0,1 µg/ml pour trouver la concentration de produit chimique d'essai qui ne franchit pas le seuil de positivité deCD86. Pour chaque épreuve, la valeur EC150 (concentration à laquelle les produits chimiques d'essai atteignent le seuil de positivité de 150 % pour CD86, voir paragraphe 19) est calculée si une réponse positive pour CD86 dépendante de la concentration est observée. Si un produit chimique d'essai induit une réponse positive pour CD86 non dépendante de la concentration, le calcul de la valeur EC150 peut ne pas être pertinent, comme décrit au protocole U-SENS™ DB-ALM n°183 (12). Pour chaque épreuve, la valeur CV70 (concentration à laquelle les produits chimiques d'essai atteignent le seuil de cytotoxicité de 70 %, voir paragraphe 19) est calculée chaque fois que possible (12). Pour évaluer l'effet reliant la concentration à la réponse pour CD86, toutes les concentrations choisies parmi les concentrations utilisables doivent être bien réparties entre l'EC150 (ou la concentration la plus élevée non cytotoxique induisant une réponse négative pour CD86) et la VC70 (ou la plus haute concentration permise, i.e. 200 µg/ml). Au moins quatre concentrations par épreuve doivent être testées, avec au moins deux concentrations communes avec la ou les épreuve(s) précédente(s), à des fins de comparaison.

▼M8

15. Le témoin de solvant/véhicule utilisé dans l'essai U-SENS™ est le milieu complet (pour les produits chimiques d'essai dissous ou en dispersion stable dans le milieu complet) (voir paragraphe 4) ou le DMSO à 0,4 % dans du milieu complet (pour les produits chimiques d'essai dissous ou en dispersion stable dans le DMSO).

16. Le témoin positif utilisé dans l'essai U-SENS™ est le TNBS (voir paragraphe 11), préparé dans du milieu complet. Le TNBS doit être utilisé comme témoin positif dans la mesure de l'expression de CD86 à une concentration finale unique dans la plaque (50 µg/ml) générant une viabilité cellulaire > 70 %. Pour arriver à une concentration de 50 µg/ml de TNBS dans la plaque, une solution de base de TNBS à 1 M (soit 293 mg/ml) dans du milieu complet est préparée, avant de procéder à une dilution de facteur de 2 930 dans du milieu complet jusqu'à obtenir une solution de travail à 100 µg/ml. L'acide lactique (CAS 50-21-5) est utilisé comme témoin négatif à 200 µg/ml dissous dans du milieu complet (à partir d'une solution de base à 0,4 mg/ml). Pour chaque plaque de chaque épreuve, trois réplicats de milieu complet témoin non traité, de témoin de solvant/véhicule et de témoins négatif et positif, sont préparés (12). D'autres témoins positifs adaptés peuvent être utilisés si des données historiques sont disponibles pour en dériver des critères d'acceptabilité comparables pour les épreuves. Les critères d'acceptabilité de l'épreuve sont identiques à ceux des produits chimiques d'essai (voir paragraphe 12).

Application des produits testés et des témoins

17. Le témoin de solvant/véhicule ou les solutions de travail décrites aux paragraphes 14 à 16 sont mélangés en proportion 1:1 (v/v) avec les suspensions de cellules préparées dans la plaque microtitre 96 puits à fond plat (voir paragraphe 12). Les plaques traitées sont placées en incubation pendant 45 ± 3 heures à 37 °C, 5 % CO_2. Avant incubation, les plaques sont scellées avec une membrane semi-perméable, afin d'éviter toute évaporation de produits chimiques d'essai volatiles et toute contamination croisée entre les cellules traitées avec les produits chimiques d'essai (12).

Coloration cellulaire

18. Après une exposition de 45 ± 3 heures, les cellules sont transférées dans une plaque microtitre à fond conique et collectées par centrifugation. L'interférence de solubilité correspond à la présence de cristaux ou de gouttelettes visibles au microscope après 45 ± 3 heures de traitement et avant coloration cellulaire. Les surnageants sont éliminés et les cellules restantes sont rincées une fois dans 100 µl tampon phosphate salin (PBS) glacé contenant 5 % sérum de veau fœtal (tampon de coloration). Les cellules sont centrifugées, puis re-suspendues dans 100 µL tampon de coloration et colorées avec 5 µl (soit 0,25 µg) anticorps anti-CD86 ou anticorps murins isotype IgG1 marqués au FITC, à 4 °C pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. Les anticorps décrits dans le protocole U-SENS™ DB-ALM n°183 (12) doivent être utilisés (pour CD86: BD-PharMingen #5556 57 Clone: Fun-1, ou Caltag/Invitrogen # MHCD8601 Clone: BU63; pour IgG1: BD-PharMingen #5557 48, ou Caltag/Invitrogen # GM4992). L'expérience acquise lors de la mise au point de l'essai indique que l'intensité de la fluorescence des anticorps est généralement comparable d'un lot à un autre. Il est possible d'utiliser d'autres clones ou d'autres fournisseurs d'anticorps pour l'essai, si ceux-ci ont été soumis avec succès à la vérification de réactivité (voir paragraphe 11). Cependant,les utilisateurs peuvent souhaiter procéder au titrage des anticorps dans leurs conditions de laboratoire, afin de déterminer la concentration la mieux adaptée. D'autres méthodes de détection, par exemple des anticorps anti-CD86 marqués avec d'autres fluorochromes, peuvent être utilisées s'il est prouvé qu'elles génèrent des résultats comparables aux anticorps marqués au FITC, par exemple en testant les substances d'épreuve figurant à l'appendice 2.2. Après deux rinçages dans 100 µl tampon de coloration et un rinçage dans 100 µl PBS glacé, les cellules

▼M8

sont suspendues dans du PBS glacé (par exemple, 125 µl pour les échantillons analysés tube après tube, manuellement, ou 50 µl pour une plaque d'auto-échantillonneur) et on ajoute la solution d'IP (concentration finale 3 µg/ml). D'autres marqueurs de cytotoxicité tels que la 7-aminoactinomycine D (7-AAD) ou le bleu de Trypan peuvent être utilisés comme colorants s'il est prouvé qu'ils génèrent des résultats comparables à l'IP, par exemple en testant les substances d'épreuve figurant à l'appendice 2.2.

Analyse par cytométrie en flux

19. Le niveau d'expression de CD86, ainsi que la viabilité cellulaire, sont analysés par cytométrie en flux. Les cellules sont placées sur graphique à points à échelle logarithmique, suivant leur taille (FSC) et leur granularité (SSC), pour repérer clairement la population dans la fenêtre R1 et éliminer les débris. L'objectif est d'acquérir 10 000 cellules dans la fenêtre R1, pour chaque puits. Les cellules appartenant à une même fenêtre R1 sont représentées sur un graphique à points FL3 ou FL4/SSC. Les cellules viables sont identifiées en traçant une deuxième fenêtre R2 de sélection de la population cellulaire négative à l'iodure de propidium (canaux FL3 ou FL4). La viabilité cellulaire est calculée par le programme d'analyse du cytomètre suivant l'équation ci-après. Si la viabilité cellulaire est faible, il convient d'acquérir jusqu'à 20 000 cellules, dont des cellules mortes. Une autre option est d'acquérir les données pendant une minute après le début de l'analyse.

$$Viabilité\ cellulaire = \frac{Nombre\ de\ cellules\ vivantes}{Nombre\ total\ de\ cellules\ acquises} \times 100$$

Le pourcentage de cellules FL1-positives est ensuite mesuré parmi les cellules viables retenues dans la fenêtre R2 (sous-fenêtre de R1). L'expression de CD86 à la surface cellulaire est analysée au moyen d'un graphique à points FL1/SSC ne prenant en compte que les cellules viables (R2).

Pour les puits contenant du milieu complet/IgG1, le seuil d'analyse est fixé proche de la population principale pour que les témoins en milieu complet présentent une valeur IgG1 dans la zone cible de 0,6 à 0,9 %.

L'interférence de couleur est définie comme un décalage de la dispersion correspondant aux IgG1 marqués au FITC (moyenne géométrique d'I.S. IgG1 FL1 ≥ 150 %).

L'indice de stimulation (I.S.) de CD86 pour les cellules témoin (non traitées ou dans du DMSO à 0,4 %) et pour les cellules traitées avec les produits chimiques est obtenu par le calcul suivant:.

$$I.S = \frac{\%\ cellules\ traitées\ CD86^{+} - \%\ cellules\ traitées\ IgG1^{+}}{\%\ cellules\ témoin\ CD86^{+} - \%\ cellules\ témoin\ IgG1^{+}} \times 100$$

% cellules témoin non traitées IgG1+: pourcentage de cellules FL1-positives reconnues par IgG1 dépassant le seuil d'analyse (plage d'acceptation ≥ 0,6 % et < 1,5 %, voir paragraphe 22) parmi les cellules viables non traitées.

% cellules témoin IgG1+ ou traitées CD86+: pourcentage de cellules FL1-positives reconnues par IgG1 ou CD86 mesuré sans déplacer le seuil d'analyse, parmi les cellules viables témoin ou traitées.

▼**M8**

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation des données

20. Les paramètres suivants sont calculés dans l'essai U-SENS™: valeur CV70, c'est-à-dire la concentration générant une survie de 70 % des cellules U937 (cytotoxicité 30 %) et la valeur EC150, c'est-à-dire la concentration à laquelle les produits chimiques d'essai induisent un indice de stimulation (I.S.) de CD86 de 150 %.

La valeur CV70 est calculée par interpolation semi-logarithmique suivant l'équation ci-après:

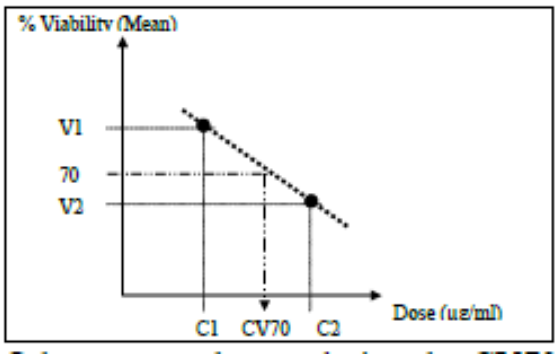
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

où:

V1 est la valeur minimum de viabilité cellulaire supérieure à 70 %

V2 est la valeur maximum de viabilité cellulaire inférieure à 70 %

C1 et C2 sont les concentrations auxquelles les viabilisés cellulaires V1 et V2 sont atteintes, respectivement.



Il est possible d'employer d'autres approches pour déduire la valeur CV70, à condition que cela ne modifie par les résultats (par exemple, en testant les substances d'épreuve).

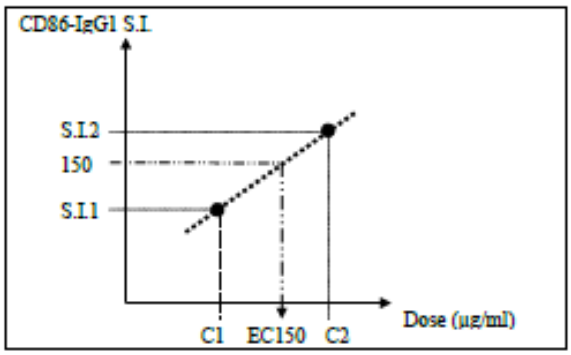
L'EC150 est calculée par interpolation log-linéaire suivant l'équation ci-après:

$$EC150 = C1 + [(150 - S.I.1) / (S.I.2 - S.I.1) * (C2 - C1)]$$

où:

C1 est la concentration la plus élevée, en µg/ml, avec un I.S. CD86 < 150 % (I.S. 1).

C2 est la concentration la plus faible, en µg/ml, avec un I.S. CD86 ≥ 150 % (I.S. 2)



▼**M8**

Les valeurs EC150 et CV70 sont calculées

— pour chaque épreuve: les valeurs EC150 et CV70 sont utilisées comme outils d'investigation de l'effet reliant la concentration à la réponse dans la surexpression de CD86 (voir paragraphe 14),

— la valeur CV70 globale est déterminée en fonction de la viabilité moyenne (12),

— la valeur EC150 globale d'un produit chimique d'essai dont la prédiction est un résultat POSITIF avec l'essai U-SENS™ est déterminée en fonction des valeurs moyennes d'I.S. CD86 (voir paragraphe 21) (12).

Modèle prédictif

21. Pour les mesures d'expression de CD86, chaque produit chimique d'essai est testé à au moins quatre concentrations et dans au moins deux épreuves indépendantes (réalisées en des jours distincts) pour arriver à une prédiction unique (NÉGATIF ou POSITIF).

— La conclusion individuelle pour une épreuve U-SENS™ est Négative (ci-après N) si l'I.S. de CD86 est inférieur à 150 % à toutes les concentrations non cytotoxiques (viabilité cellulaire $\geq$ 70 %) et si aucune interférence n'est observée (cytotoxicité, solubilité: voir paragraphe 18, ou couleur: voir paragraphe 19, quelles que soient les concentrations non cytotoxiques auxquelles l'interférence est détectée). Dans tous les autres cas: pour un I.S. de CD86 supérieur ou égal à 150 % et/ou l'observation d'une interférence, la conclusion individuelle pour une épreuve U-SENS™ est Positive (ci-après P).

— Une prédiction U-SENS™ est considérée comme NÉGATIVE si au moins deux épreuves indépendantes génèrent un résultat négatif (N) (Figure 1). Si les deux premières épreuves génèrent un résultat N, la prédiction U-SENS™ est considérée comme NÉGATIVE et il n'est pas nécessaire de réaliser une troisième épreuve.

— Une prédiction U-SENS™ est considérée comme POSITIVE si au moins deux épreuves indépendantes génèrent un résultat positif (P) (Figure 1). Si les deux premières épreuves génèrent un résultat P, la prédiction U-SENS™ est considérée comme POSITIVE et il n'est pas nécessaire de réaliser une troisième épreuve.

— Étant donné qu'aucun essai de détermination de la dose n'est mené, le cas où, lors de la première épreuve, l'I.S. de CD86 est supérieur ou égal à 150 % à la plus haute concentration non cytotoxique seulement, constitue une exception. Dans ce cas, l'épreuve est considérée comme NON CONCLUANTE (NC) et d'autres concentrations doivent être testées lors d'épreuves supplémentaires (entre la plus haute concentration non cytotoxique et la plus faible concentration cytotoxique, voir paragraphe 20). Si une épreuve est considérée comme NC, il convient de mener au moins deux épreuves supplémentaires, voire trois si les résultats des épreuves deux et trois sont non-concordants (N et/ou P, au choix) (Figure 1). Les épreuves suivantes sont considérées comme positives même si seule l'une des concentrations non cytotoxiques génère une valeur pour CD86 supérieure ou égale à 150 %, étant donné que les paramètres de concentration ont été adaptés spécifiquement à ce produit chimique d'essai. La prédiction finale s'appuie sur le résultat majoritaire pour l'ensemble des trois ou quatre épreuves individuelles (soit 2 sur 3 ou 2 sur 4) (Figure 1).

▼**M8**

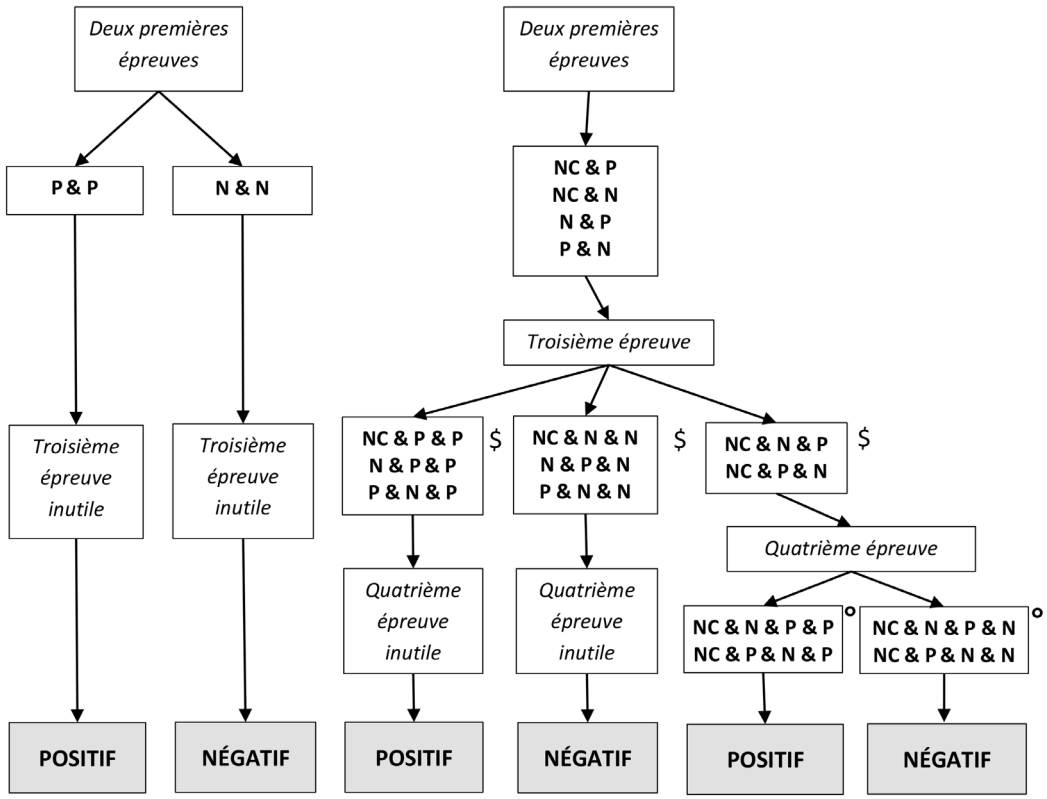


Figure 1: modèle prédictif utilisé dans l'essai U-SENS™. Toute prédiction émise avec l'essai U-SENS™ doit être considérée dans le cadre d'une approche intégrée IATA et conformément aux dispositions du paragraphe 4 et des paragraphes 7, 8 et 9 de l'introduction.

N: épreuve sans résultat positif pour CD86 ni interférence;

P: épreuve avec résultat positif pour CD86 et/ou interférence(s);

NC: non concluant. Première épreuve non concluante si CD86 est positif uniquement à la concentration non cytotoxique la plus élevée;

#: un résultat individuel non concluant (NC) attribué uniquement lors de la première épreuve nécessite de mener une troisième épreuve pour obtenir une majorité de résultats positifs (P) ou négatifs (N) pour au moins deux épreuves indépendantes sur trois.

$: les cases montrent les combinaisons pertinentes de résultats issus des trois épreuves sur la base des résultats obtenus dans les deux premières épreuves (cases précédentes);

°: les cases montrent les combinaisons pertinentes de résultats issus des quatre épreuves sur la base des résultats obtenus dans les trois premières épreuves (cases précédentes).

Critères d'acceptabilité

22. Les critères d'acceptabilité suivants doivent être remplis lors de la mise en œuvre de l'essai U-SENS™ (12)

— Après une exposition de 45 ± 3 heures, la viabilité moyenne des trois réplicats de cellules U937 non traitées doit être > 90 % et aucune dérive d'expression de CD86 ne doit être observée. La fourchette d'expression basale de CD86 dans les cellules U937 doit être ≥ 2 % et ≤ 25 %.

▼**M8**

— Si le solvant utilisé est le DMSO, la validité du DMSO comme témoin de véhicule est évaluée en calculant l'I.S. du DMSO comparé à celui des cellules non traitées et la viabilité moyenne des trois réplicats de cellules doit être > 90 %. Le témoin de véhicule DMSO est valide si l'I.S. moyen pour CD86 dans les trois réplicats de DMSO est inférieur à 250 % de l'I.S. moyen pour CD86 dans les trois réplicats de cellules U937 non traitées.

— Les épreuves sont considérées comme valides si au moins deux des trois valeurs IgG1 des cellules U937 non traitées sont comprises dans la plage ≥ 0,6 % et < 1,5 %.

— Le témoin négatif (acide lactique) testé en parallèle est considéré comme valide si au moins deux des trois réplicats génèrent un résultat négatif (I.S. CD86 < 150 %) et aucune cytotoxicité (viabilité cellulaire ≥ 70 %).

— Le témoin positif (TNBS) est considéré comme valide si au moins deux des trois réplicats génèrent un résultat positif (I.S. CD86 ≥ 150 %) et aucune cytotoxicité (viabilité cellulaire ≥ 70 %).

Rapport d'essai

23. Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes.

Produit chimique d'essai

Substance mon-constituant

— Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants;

— Apparence physique, solubilité dans le milieu complet, solubilité dans le DMSO, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques, selon les données disponibles;

— Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;

— Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);

— Concentration(s) testée(s);

— Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;

— Justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai.

Substance multi-constituants, UVCB ou mélange:

— Caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;

— Apparence physique, solubilité dans le milieu complet, solubilité dans le DMSO et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;

— Masse moléculaire ou masse moléculaire apparente dans le cas de mélanges/polymères de composition connue ou autres informations pertinentes pour la conduite de l'étude;

— Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);

— Concentration(s) testée(s);

— Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;

— Justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai.

▼**M8**

Témoins

Témoin positif:

— Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants;

— Apparence physique, solubilité dans le DMSO, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;

— Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;

— Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);

— Concentration(s) testée(s);

— Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;

— Référence aux données historiques relatives aux témoins positifs démontrant la conformité aux critères d'acceptabilité, s'il y a lieu.

Témoin négatif et solvant/véhicule témoin

— Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants;

— Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;

— Apparence physique, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, si des solvants/véhicules autres que ceux mentionnés dans la Ligne directrice sont utilisés, et selon les données disponibles;

— Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;

— Justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai.

Conditions d'essai

— Nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude;

— Description de l'essai utilisé;

— Lignée cellulaire utilisée, conditions de stockage et source (établissement d'où proviennent les cellules, par exemple);

— Type de cytométrie en flux utilisé (modèle, par exemple), en particulier paramétrage des instruments, anticorps et marqueurs de cytotoxicité utilisés;

— Procédure appliquée pour démontrer les compétences du laboratoire dans l'exécution de l'essai au moyen des substances d'épreuve de compétence et procédure appliquée pour démontrer la reproductibilité de l'essai dans le temps, par exemple données historiques des témoins et/ou des vérifications de réactivité.

Critère d'acceptabilité de l'essai

— Viabilité cellulaire et I.S. CD86 avec le témoin de solvant/véhicule comparées aux plages d'acceptabilité;

▼**M8**

— Viabilité cellulaire et I.S. avec le témoin positif comparées aux plages d'acceptabilité;

— Viabilité cellulaire de toutes les concentrations testées du produit chimique d'essai.

Mode opératoire

— Nombre d'épreuves effectuées;

— Concentration de produit chimique d'essai, application et moment d'exposition (si différents du moment recommandé)

— Durée d'exposition;

— Description des critères d'évaluation et de décision appliqués;

— Description de toutes modifications apportées au mode opératoire.

Résultats

— Tableau des données, y compris CV70 (s'il y a lieu), I.S., viabilité cellulaire, EC150 (s'il y a lieu) pour chaque produit chimique testé et substance témoin pour chaque épreuve, et indication de la classification du produit chimique d'essai d'après le modèle prédictif;

— Description de toutes autres observations pertinentes, s'il y a lieu.

Discussion des résultats

— Discussion des résultats obtenus par l'essai U-SENS™;

— Examen des résultats de l'essai dans le contexte d'une démarche intégrée (IATA), si d'autres informations pertinentes sont disponibles.

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

(1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

(2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Disponible à l'adresse suivante: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations

(3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN; doi 10.2787/815737. Disponible à l'adresse suivante: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].

(4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2760/588955. Disponible à l'adresse suivante: https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing.

(5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014.*Cosmetics* 3, 14.

▼**M8**

(6) OCDE (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Série sur les essais et évaluations No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.

(8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.

(9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.

(10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1696.

(11) OCDE. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris. Disponible à l'adresse suivante: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Accessible at: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

(13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.

(14) OCDE (2005). Série sur les essais et évaluations N° 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris. Disponible à l'adresse suivante: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(15) Nations unies (2015). Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, sixième édition révisée,, New York & Geneva: Publications des Nations unies. Disponible à l'adresse suivante: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/French/ST-SG-AC10-30-Rev6f.pdf.

(16) OCDE (2012). Série sur les essais et évaluations N° 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponible à l'adresse suivante: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Disponible à l'adresse suivante: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

▼**M8**

Appendice 2.1

DÉFINITIONS

Précision: étroitesse de l'accord entre les résultats de l'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de l'essai et l'un des aspects de sa «pertinence». Ce terme est souvent utilisé au sens de «concordance», pour qualifier la proportion de résultats corrects d'un essai (14).

AOP (Adverse Outcome Pathway, voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables): séquence d'événements conduisant à la survenue d'un effet indésirable *in vivo*, à partir de la structure chimique d'un produit chimique cible ou d'un groupe de produits chimiques similaires et de l'événement initiateur au niveau moléculaire (15).

Réponse de CD86 liée à la concentration: lorsqu'une concentration générant un résultat positif (I.S. CD86 ≥ 150) est suivie d'une concentration présentant un I.S. CD86 encore supérieur, l'effet est dépendant de la concentration (réponse liée à la concentration).

Produit chimique: une substance ou un mélange.

CV70: concentration estimée générant une viabilité cellulaire de 70 %.

Dérive: i) la valeur corrigée %$CD86^+$ pour le réplicat 3 du témoin non traité est inférieure à 50 % de la moyenne corrigée de la valeur %$CD86^+$ pour les réplicats 1 et 2 du témoin non traité; et ii) la valeur corrigée %$CD86^+$ pour le réplicat 3 du témoin négatif est inférieure à 50 % de la moyenne corrigée de la valeur %$CD86^+$ pour les réplicats 1 et 2 du témoin négatif.

EC150: concentrations estimées générant un I.S. de 150 % pour l'expression de CD86.

Cytométrie en flux: technique de cytométrie dans laquelle des cellules en suspension dans un fluide passent une par une dans un faisceau d'excitation lumineuse; la lumière est diffusée selon les caractéristiques des cellules et de leurs composants; les cellules sont souvent marquées avec des marqueurs fluorescents pour que la lumière soit d'abord absorbée puis émise à nouveau à une autre fréquence.

Danger: propriété intrinsèque d'un agent ou situation susceptible de provoquer des effets indésirables lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-) population est exposé(e) à cet agent.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment, approches intégrées en matière d'essais et d'évaluation): approche structurée utilisée dans l'identification du danger (potentiel), la caractérisation du danger (puissance) et/ou dans l'évaluation de la sécurité (potentiel de danger/puissance du danger et exposition) d'un produit chimique ou d'un groupe de produits chimiques, qui intègre de façon stratégique et pondérée toutes les données pertinentes dans le but d'informer une décision réglementaire sur le danger potentiel et/ou le risque et/ou le besoin d'effectuer d'autres tests ciblés.

Mélange: mélange ou solution constitué(e) d'au moins deux substances.

Substance mono-constituant: substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un constituant principal est présent à hauteur de 80 % minimum (m/m).

Substance multi-constituants: substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant principal est présent dans une concentration ≥ 10 % (m/m) et < 80 % (m/m). Une substance multi-constituants résulte d'un processus de fabrication. La différence entre un mélange et une substance multi-constituants est que le mélange est obtenu en associant deux substances ou plus sans réaction chimique. Une substance multi-constituants résulte d'une réaction chimique.

▼**M8**

Témoin positif: réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec une substance connue pour induire une réponse positive. Pour permettre d'évaluer la variabilité de la réponse du témoin positif dans le temps, l'ampleur de la réponse positive ne doit pas être excessive.

Pré-haptènes: produits chimiques devenant sensibilisants suite à une transformation abiotique, par exemple par oxydation.

Pro-haptènes: produits chimiques acquérant un pouvoir sensibilisant pour la peau suite à une activation enzymatique.

Pertinence: décrit la relation entre l'essai et l'effet étudié, et rend compte de l'adéquation de l'essai et de son utilité à des fins spécifiques. La pertinence indique dans quelle mesure l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) de l'essai (14).

Fiabilité: indique dans quelle mesure la mise en œuvre d'un essai peut être reproduite au cours du temps par un même laboratoire ou plusieurs laboratoires utilisant le même mode opératoire. Pour l'évaluer, on calcule la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires et la répétabilité intra-laboratoire (14).

Épreuve: consiste à tester un ou plusieurs produits chimiques parallèlement à un solvant/véhicule et à un témoin positif.

Sensibilité: proportion des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par the test. Elle permet de mesurer la précision d'un essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence de lessai (14).

I.S.: indice de stimulation. Valeur relative de la moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence (IMF) des cellules exposées au produit chimique comparée à l'IMF des cellules dans le solvant/véhicule.

Témoin de solvant/véhicule: échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, excepté le produit chimique d'essai, mais comprenant le solvant /véhicule utilisé. Il sert à déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique d'essai dissous ou en dispersion stable dans le même solvant/véhicule. Testé simultanément avec un témoin avec milieu, cet échantillon indique également si le solvant/véhicule interagit avec le système d'essai.

Spécificité: proportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'un essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence de l'essai (14).

Tampon de coloration: solution tamponnée de phosphate contenant 5 % sérum de veau fœtal.

Substance: élément chimique et ses composés à l'état naturel ou obtenus par un procédé de production, y compris tout additif nécessaire pour préserver leur stabilité ainsi que toute impureté produite par le procédé utilisé, mais à l'exclusion de tout solvant pouvant être extrait sans affecter la stabilité de la substance ni modifier sa composition.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis au présent essai.

▼**M8**

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations unies): système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans l'objectif de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (16).

UVCB: substance de composition inconnue ou variable, produit réactionnel complexe et matériaux biologiques.

Essai valide: essai dont la pertinence et la fiabilité sont jugées satisfaisantes pour des fins spécifiques, et qui repose sur des principes scientifiquement valables. Un essai n'est jamais valide dans l'absolu, mais seulement par rapport à une fin particulière (14).

▼**M8**

Appendice 2.2

SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE

Avant d'utiliser en routine l'essai décrit dans le présent appendice à la méthode d'essai B.71, les laboratoires doivent démontrer leurs compétences techniques en obtenant la prédiction attendue avec l'essai U-SENS™ pour les 10 substances recommandées au tableau 1 et en obtenant des valeurs CV70 et EC150 compatibles avec les plages de référence respectives d'au moins 8 substances d'épreuve sur 10. Ces substances ont été sélectionnées de façon à représenter la gamme des réponses possibles en ce qui concerne les dangers de sensibilisation cutanée. Les autres critères étaient la disponibilité des substances dans le commerce, ainsi que la disponibilité de données de référence *in vivo* et de données *in vitro* de grande qualité générées avec l'essai U-SENS™. De plus, les données de référence publiées sont disponibles pour l'essai U-SENS™ (1) (8).

Tableau 1

substances recommandées pour démontrer les compétences techniques relatives à l'essai U-SENS™

Substances d'épreuve de compétence	N° CAS	État physique	Prédiction *in vivo* (1)	U-SENS Solvant/Véhicule	U-SENS CV70 plage de référence en µg/ml (2)	U-SENS EC150 plage de référence en µg/ml (2)
4-Phénylènediamine	106-50-3	Solide	Sensibilisant (fort)	Milieu complet (3)	< 30	Positif (≤ 10)
Acide picrylsulfonique	2508-19-2	Liquide	Sensibilisant (fort)	Milieu complet	> 50	Positif (≤ 50)
Maléate de diéthyle	141-05-9	Liquide	Sensibilisant (modéré)	DMSO	10-100	Positif (≤ 20)
Résorcinol	108-46-3	Solide	Sensibilisant (modéré)	Milieu complet	> 100	Positif (≤ 50)
Alcool cinnamique	104-54-1	Solide	Sensibilisant (faible)	DMSO	> 100	Positif (10-100)
4-Allylanisole	140-67-0	Liquide	Sensibilisant (faible)	DMSO	> 100	Positif (< 200)
Saccharine	81-07-2	Solide	Non sensibilisant	DMSO	> 200	Négatif (> 200)
Glycérol	56-81-5	Liquide	Non sensibilisant	Milieu complet	> 200	Négatif (> 200)
Acide lactique	50-21-5	Liquide	Non sensibilisant	Milieu complet	> 200	Négatif (> 200)
Acide salicylique	69-72-7	Solide	Non sensibilisant	DMSO	> 200	Négatif (> 200)

Abréviations: N°CAS = Numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service

(1) Prédiction de danger (et de puissance) *in vivo* d'après les données ELGL (1) (8). La puissance *in vivo* est obtenue d'après les critères proposés par l'ECETOC (17).

(2) Basée sur les valeurs historiques observées (1) (8).

(3) Milieu complet: milieu RPMI-1640 supplémenté avec 10 % sérum de veau fœtal, 2 mM L-glutamine, 100 unités/ml pénicilline et 100 µg/ml streptomycine (8).

▼**M8**

Appendice 3

SENSIBILISATION CUTANÉE *IN VITRO*: ESSAI IL-8 LUC

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

1. Contrairement à des essais visant à analyser le niveau d'expression de marqueurs de surface, le test IL-8 Luc permet de quantifier les variations d'expression de IL-8, une cytokine associée à l'activation des DC. Dans la lignée cellulaire rapporteur IL-8 dérivée de la lignée THP-1 (THP-G8, issue de la lignée cellulaire de leucémie monocytaire humaine THP-1), l'expression d'IL-8 est mesurée à la suite de l'exposition à des sensibilisants (1). Le niveau d'expression de la luciférase est ensuite utilisé pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés.

2. 18. L'essai IL-8 Luc a fait l'objet d'une étude de validation (2) menée par le Centre japonais de validation des méthodes de substitution (JaCVAM), le **Ministère de l'économie, du commerce et de l'industrie** (METI) et la Société japonaise pour les méthodes **alternatives à l'expérimentation animale (JSAAE)**, suivie d'un examen indépendant par des pairs (3) sous la conduite du JaCVAM et du Ministère de la santé, du travail et des affaires sociales (MHLW), avec l'appui de la **Coopération internationale relative aux méthodes de substitution à l'expérimentation animale** (ICATM). Après analyse des preuves disponibles et sur avis des organismes de régulation et des parties prenantes, l'essai IL-8 Luc est considéré comme utile dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA, pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants à des fins de classification et d'étiquetage des dangers. On trouvera dans la littérature des exemples d'utilisation des données IL-8 Luc combinées à d'autres sources d'information (4) (5) (6).

3. Il a été démontré que l'essai IL-8 Luc est transférable à des laboratoires expérimentés dans le domaine des cultures cellulaires et des mesures de la luciférase. Le niveau de reproductibilité était de l'ordre de 87,7 % intra-laboratoire et 87,5 % inter-laboratoires (2). Les données obtenues lors de l'étude de validation (2) et dans les autres travaux publiés (1) (6) démontrent que, comparé à l'ELGL, l'essai IL-8 Luc a permis d'émettre une prédiction positive ou négative pour 118/143 produits chimiques, a fourni des résultats non concluants pour 25 produits chimiques et présente une précision de 86 % (101/118), une sensibilité de 96 % (92/96) et une spécificité de 41 % (9/22) pour faire la distinction entre les produits chimiques sensibilisants (catégorie 1 du SGH de l'ONU) et non sensibilisants («sans catégorie» selon le SGH de l'ONU). En ne tenant pas compte des substances en dehors du domaine d'applicabilité de la méthode, voir ci-dessous (paragraphe 5), l'essai IL-8 Luc a permis de classer 113/136 produits chimiques comme positifs ou négatifs, et 23 produits chimiques comme non concluants. La précision de l'essai IL-8 Luc est de 89 % (101/113), la sensibilité est de 96 % (92/96) et la spécificité est de 53 % (9/17). Reprenant des données chez l'humain citées dans Urbisch et al. (7), l'essai IL-8 Luc a permis de classer 76/90 produits chimiques comme positifs ou négatifs, et 14 produits chimiques comme non concluants. La précision de l'essai IL-8 Luc est de 80 % (61/76), la sensibilité est de 93 % (54/58) et la spécificité est de 39 % (7/18). En ne tenant pas compte des substances en dehors de son domaine d'applicabilité, l'essai IL-8 Luc a permis de classer 71/84 produits chimiques comme positifs ou négatifs et 13 produits chimiques comme non concluants. La précision de l'essai IL-8 Luc est de 86 % (61/71), la sensibilité est de 93 % (54/58) et la spécificité est de 54 % (7/13). Il est probable que les faux-négatifs dans les prédictions effectuées avec l'essai IL-8 Luc concernent plus de produits chimiques ayant une puissance de sensibilisation de la peau faible à modérée (sous-catégorie 1B du SGH/CLP) que de produits chimiques ayant une puissance de sensibilisation de la peau élevée (sous-catégorie 1A du SGH/CLP) (6). Dans leur ensemble, les informations indiquent que l'essai IL-8 Luc aide à évaluer le potentiel de sensibilisation

▼**M8**

cutanée des produits chimiques. Les valeurs relatives à la précision de l'essai IL-8 Luc utilisé seul n'ont qu'un caractère indicatif, car cet essai doit être combiné à d'autres sources d'information dans le contexte d'une démarche IATA, et conformément aux dispositions énoncées aux paragraphes 7 et 8 et en introduction. Au demeurant, dans l'évaluation des essais de sensibilisation cutanée sans expérimentation animale, il convient de tenir compte du fait que l'ELGL et les autres essais sur animaux ne reflètent peut-être pas parfaitement la situation chez l'être humain.

4. Les données actuellement disponibles montrent que l'essai IL-8 Luc est applicable à des produits chimiques couvrant divers groupes fonctionnels organiques, mécanismes de réaction, puissances de sensibilisation cutanée (telles qu'établies par des études *in vivo*) et propriétés physico-chimiques (2) (6).

5. Certes, l'essai IL-8 Luc utilise le solvant X-VIVO™ 15, cependant il permet de classer correctement les produits chimiques présentant un Log K_{oe} > 3,5 et ceux présentant une hydrosolubilité autour de 100 µg/ml telle que calculée avec le logiciel EPI Suite™. En outre, les performances de la méthode pour détecter les sensibilisants faiblement hydrosolubles sont meilleures que celles de l'essai IL-8 Luc utilisant le diméthylsulfoxyde (DMSO) comme solvant (2). Cependant, des résultats négatifs obtenus avec des produits chimiques d'essai non dissous à 20 mg/mL peuvent être des faux négatifs, car les produits chimiques sont insolubles dans le X-VIVO™ 15. Par conséquent, pour ces produits chimiques, les résultats négatifs ne doivent être considérés. Lors de l'étude de validation, un taux élevé de faux négatifs a été observé pour les anhydrides. De plus, en raison des capacités métaboliques limitées de la lignée cellulaire utilisée (8) ainsi que des conditions expérimentales, les pro-haptènes (substances nécessitant une activation enzymatique) et les pré-haptènes (substances activées par oxydation), peuvent eux aussi donner des résultats négatifs avec cet esai. Il est à noter que, bien que les résultats négatifs obtenus avec de potentiels pré- ou pro-haptènes doivent être interprétés avec précaution, l'essai IL-8 Luc a permis d'identifier correctement 11/11 pré-haptènes, 6/6 pro-haptènes et 6/8 pré- ou pro-haptènes dans la base de données IL-8 Luc (2). L'examen complet récemment mené sur trois essais sans expérimentation animale (DPRA, KeratinoSens™ et h-CLAT) pour l'identification des pré- et pro-haptènes (9) et le fait que les cellules THP-G8 utilisées dans l'essai IL-8 Luc soient une lignée issue de la lignée THP-1 utilisée dans l'essai h-CLAT, permettent de conclure que l'essai IL-8 Luc, combiné avec d'autres essais, peut contribuer à améliorer la sensibilité des essais sans expérimentation animale dans la détection des pré- et pro-haptènes. Les surfactants testés à ce jour ont généré des (faux) positifs, quel que soit leur type (cationique, anionique ou non ionique). Pour finir, les produits chimiques qui interfèrent avec la luciférase peuvent masquer son activité ou en empêcher les mesures, ce qui peut résulter en une apparente inhibition ou une luminescence accrue (10). Par exemple, il a été rapporté que les concentrations en phyto-œstrogènes supérieures à 1 µM provoquent une interférence avec les signaux luminescents dans d'autres essais par gène rapporteur de la luciférase, à cause d'une sur-activation du gène rapporteur de la luciférase. Par conséquent, l'expression de la luciférase observée en présence d'une forte concentration de phyto-œstrogènes ou de composés suspectés d'activer le gène rapporteur de la luciférase de manière similaire doit être examinée avec précaution (11). En se basant sur les critères ci-dessus, les surfactants, les anhydrides et les produits chimiques qui interfèrent avec la luciférase sont exclus du champ d'application de la présente méthode. S'il est démontré que l'essai IL-8 Luc n'est pas applicable à d'autres catégories spécifiques de produits chimiques d'essai, cette méthode ne doit pas leur être appliquée.

6. Comme indiqué ci-dessus, l'essai IL8-Luc aide à distinguer les sensibilisants cutanés des non-sensibilisants. Des travaux complémentaires, s'appuyant de préférence sur des données humaines, seront toutefois nécessaires pour déterminer si les résultats de l'essai IL8-Luc pourraient contribuer à l'évaluation de la puissance de sensibilisation dans le cadre d'une approche combinant d'autres sources d'information.

▼**M8**

7. Les définitions sont fournies à l'Appendice 3.1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

8. L'essai IL-8 Luc utilise la lignée cellulaire de leucémie monocytaire humaine, THP-1, obtenue auprès de l'*American Type Culture Collection* (Manassas, VA, USA). À partir de cette lignée THP-1, le département de dermatologie de l'école de médecine à l'université de Tohoku a développé la lignée THP-G8 rapporteur IL-8, laquelle contient les gènes de la luciférase orange (Stable Luciferase Orange, SLO) et rouge (Stable Luciferase Red, SLR) placés sous le contrôle des promoteurs de IL-8 et de la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), respectivement (1). Ce système permet de quantifier l'induction du gène de la luciférase en détectant la luminescence issue d'un substrat de luciférase connu pour son émission lumineuse, comme indicateur de l'activité de IL-8 et de la GAPDH dans les cellules à la suite de l'exposition à des produits chimiques sensibilisants.

9. Le test bi-couleurs comprend une luciférase émettant dans l'orange (SLO,rλmax = 580 nm) (12), marqueur de l'activation du promoteur IL-8, ainsi qu'une luciférase émettant dans le rouge (SLR,nλmax = 630 nm) (13), marqueur de l'activation du promoteur interne témoin, GAPDH. Les deux luciférases émettent dans des couleurs différentes lorsqu'elles réagissent à la d-luciférine de luciole, leur luminescence est mesurée en parallèle, lors d'une réaction en une étape, en subdivisant la lumière émise dans le mélange d'essai à l'aide d'un filtre optique (14) (voir Appendice 3.2II).

10. Les cellules THP-G8 sont traitées pendant 16 heures avec un produit chimique d'essai, puis l'activité de la luciférase SLO (SLO-LA), marqueur de l'activité du promoteur IL-8, et l'activité de la luciférase SLR (SLR-LA), marqueur de l'activité du promoteur GAPDH, sont mesurées. Par souci de lisibilité, SLO-LA et SLR-LA sont respectivement appelées IL8LA et GAPLA. On trouvera au tableau 1 une description des termes associés à l'activité de la luciférase dans l'essai IL-8 Luc. Les valeurs mesurées sont utilisées pour calculer l'IL8LA normalisée (nIL8LA), c'est-à-dire le ratio IL8LA/GAPLA. L'induction de nIL8LA (Ind-IL8LA) est le ratio de la moyenne arithmétique des quatre valeurs mesurées de nIL8LA des cellules THP-G8 traitées avec le produit chimique d'essai, divisée par la moyenne des valeurs de nIL8LA des cellules THP-G8 non traitées. L'inhibition de GAPLA (Inh-GAPLA) est le ratio de la moyenne arithmétique des quatre valeurs mesurées de GAPLA des cellules THP-G8 traitées avec le produit chimique d'essai, divisée par la moyenne des valeurs de GAPLA des cellules THP-G8 non traitées. Inh-GAPLA est un marqueur de cytotoxicité.

Tableau 1

Description des termes associés à l'activité de la luciférase dans l'essai IL-8 Luc

Abréviations	Définition
GAPLA	Activité de la luciférase rouge SLR indicative de l'activité du promoteur GAPDH
IL8LA	Activité de la luciférase orange SLO indicative de l'activité du promoteur IL-8
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA des cellules THP-G8 exposées aux produits chimiques / nIL8LA des cellules non exposées

▼**M8**

Abréviations	Définition
Inh-GAPLA	GAPLA des cellules THP-G8 exposées aux produits chimiques / GAPLA des cellules non exposées
CV05	La plus faible concentration du produit chimique à laquelle Inh-GAPLA est < 0,05.

11. Des normes de performance (15) permettent de simplifier la validation d'essais *in vitro* modifiés utilisant des tests IL-8 Luciférase similaires au test IL-8 Luc, et de modifier rapidement la ligne directrice 442E de l'OCDE pour y intégrer ces essais. L'acceptation mutuelle des données (AMD) ne sera garantie que pour les essais validés selon les normes de performance, si ces essais ont été examinés et ajoutés à la ligne directrice 442E par l'OCDE (16).

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

12. Avant d'utiliser en routine l'essai décrit dans le présent appendice à la méthode d'essai B.71, les laboratoires devront faire la preuve de leurs compétences techniques, en réalisant l'essai sur les dix substances d'épreuve listées à l'appendice 3.3 et conformément aux Bonnes pratiques des méthodes *in vitro* (17). En outre, les utilisateurs de l'essai devront conserver une base de données historiques générées avec les vérifications de réactivité (voir paragraphe 15), avec le témoin positif et avec le témoin de solvant/ véhicule (voir paragraphes 21-24), et devront utiliser ces données pour confirmer la reproductibilité de l'essai dans le temps au sein de leur laboratoire.

PROCÉDURE

13. Le mode opératoire de référence pour l'essai IL-8 Luc est disponible et doit être suivi lors de la mise en œuvre de la méthode d'essai (18). Les laboratoires souhaitant mener cet essai peuvent obtenir la lignée cellulairerecombinante THP-G8 auprès du laboratoire GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japon après signature d'un accord de transfert de matériel, en ligne avec les conditions énoncées dans le modèle OCDE. Les paragraphes qui suivent fournissent une description des principaux composants et protocoles de l'essai.

Préparation des celluless

14. Il convient d'utiliser la lignée cellulaire THP-G8 du laboratoire GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japon, pour mener l'essai IL-8 Luc (voir paragraphes 8 et 13). À leur réception, les cellules sont repiquées (2-4 repiquages) et congelées pour être stockées en réserve homogène. Les cellules de cette réserve peuvent être repiquées jusqu'à six semaines, sans dépasser 12 repiquages. Le milieu de culture utilisé pour le repiquage est le RPMI-1 640 contenant 10 % sérum bovin fœtal (SBF), une solution d'antibiotique/ antimycosique (100 U/ml pénicilline G, 100 µg/ml streptomycine et 0,25 µg/ml amphotéricine B dans une solution saline à 0,85 %) (GIBCO Cat#15 240-062, par exemple), 0,15 µg/ml puromycine (CAS:58-58-2, par exemple) et 300 µg/ml G418 (CAS:1083 21-42-2, par exemple).

15. Avant utilisation des cellules pour l'essai, elles doivent être qualifiées par une vérification de réactivité. Cette vérification doit être effectuée une à deux semaines, ou 2 à 4 repiquages, après décongélation, avec comme témoin positif le 4-nitrobenzyle bromure (4-NBB) (CAS:100-11-8, pureté ≥ 99 %) et comme témoin négatif l'acide lactique (CAS:50-21-5, pureté ≥ 85 %). Le 4-NBB doit générer une réponse positive pour Ind-IL8LA (≥ 1,4), l'acide lactique doit générer une réponse négative pour Ind-IL8LA (< 1,4). Seules les cellules ayant réussi la vérification de réactivité sont utilisées pour l'essai. La vérification est réalisée suivant la procédure décrite aux paragraphes 22-24.

▼M8

16. Pendant l'essai, les cellules THP-G8 sont ensemencées à une densité de 2 à 5 × 10^5 cellules/ml, puis placées en préculture dans des flacons de culture pendant 48 à 96 heures. Le jour de l'essai, les cellules sont récoltées depuis le flacon de culture et rincées avec du RPMI-1 640 contenant 10 % SBF sans antibiotiques, puis suspendues à une densité de 1 × 10^6 cellules/ml dans du RPMI-1 640 contenant 10 % SBF sans antibiotiques. Les cellules sont enduites réparties dans une plaque microtitre noire 96 puits à fond plat (Costar Cat#3 603, par exemple) à raison de 50 µl par puits (5 × 10^4 cellules/puits).

Préparation du produit chimique d'essai et des substances témoin

17. Les produits chimiques d'essai et les substances témoin sont préparés le jour de l'essai. Dans la méthode IL-8 Luc, les produits chimiques d'essai sont dissous dans du X-VIVO™ 15, un milieu sans sérum disponible dans le commerce (Lonza, 04-418Q), jusqu'à une concentration finale de 20 mg/ml. Le milieu X-VIVO™ 15 est ajouté à 20 mg de produit chimique d'essai (quelle que soit la solubilité du produit chimique) dans un microtube, puis l'on complète pour atteindre un volume de 1 ml, le tube est mélangé vigoureusement et placé sur un mélangeur rotatif à une vitesse maximale de 8 rpm pendant 30 minutes à température ambiante (environ 20°C). De plus, si les produits chimiques solides restent insolubles, le tube est soumis à une sonication jusqu'à dissolution complète du produit chimique ou jusqu'à obtention d'une dispersion stable. Si les produits chimiques sont solubles dans le X-VIVO™ 15, la solution est diluée suivant un facteur 5 dans du X-VIVO™ 15 et utilisée comme solution de base des produits chimiques dans le X-VIVO™ 15 (4 mg/ml). Si les produits chimiques sont non-solubles dans le X-VIVO™ 15, le mélange est à nouveau mélangé par rotation pendant au moins 30 minutes, puis centrifugé à 15 000 rpm (≈20 000*g*) pendant 5 minutes. Le surnageant obtenu est utilisé comme solution de base des produits chimiques dans le X-VIVO™ 15. Si d'autres solvants sont utilisés, par exemple le DMSO, l'eau ou du milieu de culture, les raisons scientifiques de ce choix doivent être expliquées. La procédure détaillée de dilution des produits chimiques est fournie à l'appendice 3.5. Les solutions de X-VIVO™ 15 décrites aux paragraphes 18-23 sont mélangées à 1:1 (v/v) avec les cellules en suspensions préparées dans la plaque microtitre noire 96 puits à fond plat (voir paragraphe 16).

18. La première épreuve a pour but de déterminer la concentration cytotoxique et d'évaluer le potentiel de sensibilisation cutanée des produits chimiques. Une série de dilutions de facteur 2 des solutions de base des produits chimiques dans le X-VIVO™ 15 est réalisée avec du X-VIVO™ 15 (voir Appendice 3.5), dans une plaque microtitre 96 puits (Costar Cat#EW-01 729-03, par exemple). Ensuite, dans chaque puits d'une plaque microtitre noire 96 puits à fond plat, on ajoute 50 µl de solution diluée à 50 µl de cellules en suspension. En conséquence, pour les produits chimiques d'essai solubles dans le X-VIVO™ 15, la concentration finale de produit chimique se situe dans une fourchette allant de 0,002 à 2 mg/ml (Appendice 3.5). Pour les produits chimiques d'essai non solubles dans le X-VIVO™ 15 à 20 mg/ml, seuls des facteurs de dilution allant de 2 à 2^{10} sont prévus, bien que les concentrations finales réelles des produits chimiques d'essai restent approximatives et dépendent de la concentration de saturation des produits chimiques d'essai dans la solution de base X-VIVO™ 15.

19. Dans les épreuves suivantes (réplicats deux, trois et quatre), la solution de base X-VIVO™ 15 est préparée à une concentration quatre fois supérieure à la concentration de viabilité cellulaire 05 (CV05, la concentration la plus faible à laquelle Inh-GAPLA < 0,05) observée lors de la première épreuve. Si la valeur Inh-GAPLA ne baisse pas sous la limite de 0,05 à la plus haute concentration testée dans la première épreuve, la solution de base X-VIVO™ 15 est préparée à la concentration la plus élevée de la première épreuve. La concentration CV05 est calculée en divisant la concentration de la solution de base de la première épreuve par le facteur de dilution de CV05 (X) nécessaire pour diluer la solution de base au point d'atteindre la valeur CV05 (voir Appendice 3.5). Pour tester les substances non solubles dans le X-VIVO à 20 mg/mL, la CV05 est déterminée par la concentration de la solution de base × 1/X. Pour les épreuves 2 à 4, une seconde solution de base est préparée à une concentration de 4 × CV05 (Appendice 3.5).

▼**M8**

20. Une série de dilutions des secondes solutions de base de X-VIVO™ 15 est réalisée suivant un facteur 1,5 dans une plaque microtitre 96 puits. Ensuite, dans une plaque microtitre noire 96 puits à fond plat, on ajoute 50 µl/puits de la solution diluée à 50 µl/puits de suspension cellulaire. Chaque concentration de chaque produit chimique d'essai est testée dans 4 puits. Les échantillons sont ensuite mélangés sur un agitateur de plaques et incubés pendant 16 heures à 37°C, 5 % CO_2, puis l'activité de la luciférase est mesurée conformément à la procédure décrite ci-dessous. Pour établir une prédiction positive ou négative, il faut avoir testé les produits chimiques d'essai dans 4 épreuves au maximum avec l'essai IL-8 Luc.

21. Le témoin de solvant est un mélange de 50 µl/puits de X-VIVO™ 15 et de 50 µl/puits de suspension cellulaire dans du RPMI-1 640 contenant 10 % SBF.

22. Le témoin positif recommandé est le 4-NBB. À 20 mg de 4-NBB placés dans un microtube de 1,5 ml, on ajoute du X-VIVO™ 15 jusqu'à atteindre 1 ml. Le tube est mélangé vigoureusement et placé sur un mélangeur rotatif à une vitesse maximale de 8 rpm pendant au minimum 30 minutes, puis centrifugé à 20 000 g pendant 5 minutes. Le surnageant obtenu est dilué suivant un facteur 4 dans le X-VIVO™ 15, puis 500 µl du surnageant dilué sont transférés dans un puits sur une plaque microtitre 96 puits. Le surnageant dilué est à nouveau dilué dans du X-VIVO™ 15 suivant des facteurs 2 et 4, puis on ajoute 50 µl des solutions à 50 µl de cellules THP-G8 en suspension dans une plaque microtitre noire 96 puits à fond plat (Appendice 3.6). Chaque concentration du témoin positif est testée dans 4 puits. La plaque microtitre est agitée sur un agitateur de microplaques et incubée dans un incubateur à CO_2 pendant 16 heures (37°C, 5 % CO_2), puis l'activité de la luciférase est mesurée conformément à la procédure décrite au paragraphe 29.

23. Le témoin négatif recommandé est l'acide lactique. À 20 mg d'acide lactique placés dans un microtube de 1,5 ml, on ajoute du X-VIVO™ 15 (20 mg/ml) jusqu'à atteindre 1 ml. On dilue la solution d'acide lactique à 20 mg/ml suivant un facteur 5 dans du X-VIVO™ 15 (4 mg/ml), puis 500 µl de cette solution d'acide lactique à 4 mg/ml sont transférés dans un puits sur une plaque microtitre 96 puits. Cette solution est diluée suivant un facteur 2 dans du X-VIVO™ 15, puis re-diluée suivant un facteur 2 pour produire des solutions à 2 mg/ml et 1 mg/ml. On ajoute 50 µl de ces trois solutions et de témoin de véhicule (X-VIVO™ 15) aux cellules THP-G8 dans une plaque microtitre noire 96 puits à fond plat. Chaque concentration du témoin négatif est testée dans 4 puits. La plaque microtitre est agitée sur un agitateur de microplaques et incubée dans un incubateur à CO_2 pendant 16 heures (37°C, 5 % CO_2), puis l'activité de la luciférase est mesurée conformément à la procédure décrite au paragraphe 29.

24. D'autres témoins positifs ou négatifs adaptés peuvent être utilisés si des données historiques sont disponibles pour en dériver des critères d'acceptabilité comparables pour les épreuves.

25. Des précautions doivent être prises contre l'évaporation des produits chimiques d'essai volatiles et pour éviter toute contamination croisée entre puits par les produits chimiques d'essai (en scellant la plaque avant incubation avec les produits chimiques d'essai, par exemple).

26. Pour établir une prédiction positive ou négative, il faut avoir testé les produits chimiques d'essai et le témoin de solvant dans 2 à 4 épreuves (voir Tableau 2). Les épreuves sont réalisées en plusieurs jours distincts, avec des solutions de base des produits chimiques dans le X-VIVO™ 15 fraiches et des cellules récoltées séparément. Les cellules peuvent être issues du même repiquage.

▼M8

Mesure de l'activité de la luciférase

27. La luminescence est mesurée à l'aide d'un luminomètre pour microplaques 96 puits équipé de filtres optiques, par exemple les séries Phelios (ATTO, Tokyo, Japon), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Allemagne) ou ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Le luminomètre doit être étalonné pour chaque essai, afin de garantir une bonne reproductibilité des mesures (19). Des luciférases recombinantes orange et rouge sont disponibles pour effectuer l'étalonnage.

28. On transfère 100 µl de réactif pré-chauffé Tripluc® Luciférase (Tripluc) dans chaque puits de la plaque microtitre qui contient la suspension cellulaire traitée avec ou sans produit chimique d'essai. La plaque est agitée pendant 10 minutes à température ambiante (environ 20°C) avant d'être placée dans le luminomètre pour mesurer l'activité de la luciférase. La bioluminescence est mesurée pendant 3 secondes sans filtre optique (F0), puis 3 secondes avec filtre optique (F1). Le recours à d'autres réglages doit être justifié, par exemple pour s'adapter au modèle de luminomètre utilisé.

29. Pour chaque concentration, les paramètres sont calculés à partir des valeurs mesurées, par exemple IL8LA, GAPLA, nIL8La, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, la moyenne avec écart type pour IL8LA, la moyenne avec écart type pour GAPLA, la moyenne avec écart type pour nIL8LA, la moyenne avec écart type pour Ind-IL8LA, la moyenne avec écart type pour Inh-GAPLA et l'intervalle de confiance à 95 % pour Ind-IL8LA. Les définitions des paramètres utilisés dans le présent paragraphe sont fournies aux Appendices 3.1 et 3.4, respectivement.

30. Avant de procéder aux mesures dans un essai à rapporteur multi-couleurs, il convient de réaliser un discernement des couleurs, généralement à l'aide de détecteurs (luminomètre et lecteur de plaque) équipés de filtres optiques tels que des filtres coupe-bande (filtres passe-haut ou passe-bas) ou des filtres passe-bande. Il convient d'étalonner les coefficients de transmission des filtres pour chaque signal coloré bioluminescent avant l'essai, voir Appendice 3.2.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation des données

31. Pour émettre une prédiction positive ou négative, les critères à respecter dans chaque épreuve sont les suivants:

— une prédiction avec l'essai IL-8 Luc est considérée comme positive si un produit chimique d'essai présente une valeur Ind-IL8LA $\geq$ 1,4 et si la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % pour Ind-IL8LA est $\geq$ 1,0

— une prédiction avec l'essai IL-8 Luc est considérée comme négative si un produit chimique d'essai présente une valeur Ind-IL8LA < 1,4 ou si la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % pour Ind-IL8LA est < 1,0

Modèle prédictif

32. Les produits chimiques d'essai qui donnent deux résultats positifs lors de la 1ere, 2e, 3e ou 4e épreuve sont considérés comme positifs, tandis que ceux qui donnent trois résultats négatifs lors de la 1ere, 2e, 3e ou 4e épreuve sont considérés comme potentiellement négatifs (Tableau 2). Parmi les produits chimiques potentiellement négatifs, ceux qui sont dissous à 20 mg/ml dans le X-VIVO™ 15 sont considérés comme négatifs, tandis que ceux qui ne sont pas dissous à 20 mg/ml dans le X-VIVO™ 15 ne sont pas pris en considération (Figure 1).

▼**M8**

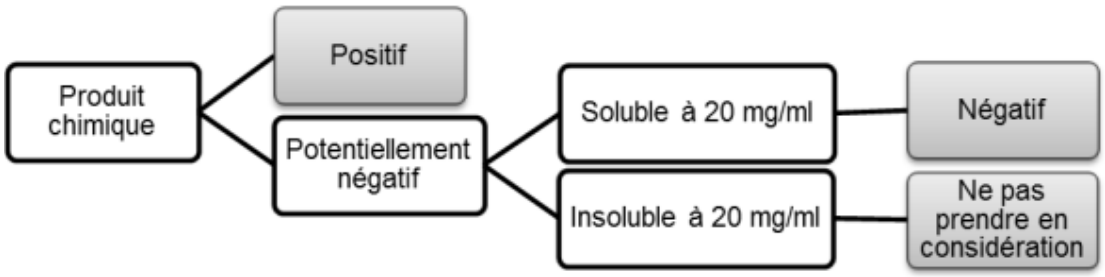
Tableau 2

critères d'identification des produits positifs et potentiellement négatifs

Épreuve 1	Épreuve 2	Épreuve 3	Épreuve 4	Prédiction finale
Positif	Positif	–	–	Positif
	Négatif	Positif	–	Positif
		Négatif	Positif	Positif
			Négatif	Potentiellement négatif
Négatif	Positif	Positif	–	Positif
		Négatif	Positif	Positif
			Négatif	Potentiellement négatif
	Négatif	Positif	Positif	Positif
			Négatif	Potentiellement négatif
		Négatif	–	Potentiellement négatif

Figure 1

modèle prédictif pour la décision finale



Critère d'acceptabilité

33. Les critères d'acceptabilité suivants doivent être remplis lorsque l'essai IL-8 Luc est mené:

— la valeur Ind-IL8LA doit être de 5,0 au minimum à au moins une concentration du témoin positif, 4-NBB, pour chaque essai.

— la valeur Ind-IL8LA doit être de 1,4 au maximum à toutes les concentrations du témoin négatif, l'acide lactique, pour chaque essai.

— il n'est pas tenu compte des données issues de plaques pour lesquelles la valeur GAPLA des puits témoin, contenant des cellules et du Tripluc mais pas de produits chimiques, est inférieure à 5 fois la valeur des puits contenant le milieu d'essai seul (50 µl/puits de RPMI-1 640 contenant 10 % SBF et 50 µl/puits de X-VIVO™ 15).

— il n'est pas tenu compte des données issues de plaques pour lesquelles la valeur Inh-GAPLA à toutes les concentrations des produits chimiques d'essai ou des témoins est inférieure à 0,05; dans ce cas, la première épreuve est reproduite de telle sorte que la concentration finale la plus élevée dans le réplicat soit la plus basse concentration finale de l'épreuve précédente.

▼M8

Rapport d'essai

34. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Produits chimiques d'essai

Substance mono-constituant:

— Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants;

— Apparence physique, hydrosolubilité, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques, selon les données disponibles;

— Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;

— Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);

— Solubilité dans le X-VIVOTM 15. Pour les produits chimiques insolubles dans le X-VIVOTM 15, indiquer si un précipité ou une flottation sont observés après centrifugation;

— Concentration(s) testée(s);

— Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;

— Justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai si le X-VIVOTM 15 n'a pas été utilisé.

Substance multi-constituants, UVCB et mélange:

— Caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;

— Apparence physique, hydrosolubilité et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;

— Masse moléculaire ou masse moléculaire apparente dans le cas de mélanges/polymères de composition connue ou autres informations pertinentes pour la conduite de l'étude;

— Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);

— Solubilité dans le X-VIVOTM 15. Pour les produits chimiques insolubles dans le X-VIVOTM 15, indiquer si un précipité ou une flottation sont observés après centrifugation;

— Concentration(s) testée(s);

— Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

— Justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai si le X-VIVOTM 15 n'a pas été utilisé.

Témoins

Témoin positif:

— Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants;

— Apparence physique, hydrosolubilité, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles et s'il y a lieu;

▼**M8**

— Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;

— Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);

— Concentration(s) testée(s);

— Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;

— Référence aux données historiques relatives aux témoins positifs démontrant la conformité aux critères d'acceptabilité, s'il y a lieu.

Témoin négatif:

— Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS et/ou autres identifiants;

— Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;

— Apparence physique, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, si des témoins négatifs autres que ceux mentionnés dans la Ligne directrice sont utilisés, et selon les données disponibles;

— Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;

— Justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai.

Conditions d'essai

— Nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude;

— Description de l'essai utilisé;

— Lignée cellulaire utilisée, conditions de stockage et origine (établissement d'où proviennent les cellules, par exemple);

— Numéro de lot et origine du SBF, nom du fournisseur, numéro de lot de la plaque microtitre noire 96 puits à fond plat, numéro de lot du réactif Tripluc;

— Nombre de repiquages et densité cellulaire au moment de l'essai;

— Méthode de numération cellulaire utilisée pour l'ensemencement avant l'essai et mesures mises en oeuvre pour garantir une répartition homogène des cellules;

— Luminomètre utilisé (modèle, par exemple), y compris réglages de l'instrument, substrat de luciférase utilisé, démonstration de l'adéquation des mesures de luminescence avec les témoins décrits à l'Appendice 3.2;

— Procédure suivie pour la démonstration de la compétence du laboratoire dans l'exécution de l'essai (en testant les substances d'épreuve, par exemple) ou pour la démonstration de la reproductibilité de l'essai dans le temps.

Mode opératoire

— Nombre de réplicats et d'épreuves;

— Concentration des produits chimiques d'essai, procédure d'application et durée d'exposition (si celles-ci diffèrent des recommandations);

▼**M8**

— Description des critères d'évaluation et de décision appliqués;

— Description des critères d'acceptabilité de l'étude utilisés;

— Description de toutes modifications apportées au mode opératoire.

Résultats

— Mesures de IL8LA et GAPLA;

— Calculs de nIL8LA, Ind-IL8LA et Inh-GAPLA;

— Intervalle de confiance à 95 % pour Ind-IL8LA;

— Graphique présentant les courbes dose-effet pour l'induction de l'activité de la luciférase et la viabilité;

— Description de toute autre observation pertinente, s'il y a lieu.

Discussion des résultats

— Discussion des résultats obtenus avec l'essai IL-8 Luc;

— Examen des résultats de l'essai dans le contexte d'une démarche intégrée (IATA), si d'autres informations pertinentes sont disponibles.

Conclusion

BIBLIOGRAPHIE

(1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci 124:359-69.

(2) OCDE (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Série sur les essais et évaluationsN° 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris. Disponible à l'adresse suivante: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(3) OCDE (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Série sur les essais et évaluationsN° 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris. Disponible à l'adresse suivante: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(4) OCDE (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Série sur les essais et évaluations N° 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris. Disponible à l'adresse suivante: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol 69:371-9.

(6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. Toxicol *In Vitro* 29:1816-30.

▼**M8**

(7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337-51.

(8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

(9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.

(10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.

(11) OCDE (2016). Ligne directrice N° 455: Ligne directrice axée sur la performance pour les essais in vitro de transactivation par transfection stable visant la détection des substances agonistes et antagonistes des récepteurs des oestrogènes, Publications de l'OCDE, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

(12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.

(13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.

(14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.

(15) OCDE (2017). To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Série sur les essais et évaluations. OCDE, Paris, France.

(16) OCDE (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Série de l'OCDE sur les essais et évaluations N° 34. OCDE, Paris, France.

(17) OCDE (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation de coopération et de développement économiques, , Paris. Disponible à l'adresse suivante: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Available at. http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

(19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046-9.

▼**M8**

(20) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Série sur les essais et évaluations N° 168. OCDE, Paris, France.

(21) Nations unies (2015). Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques dangereux (SGH). Sixième édition révisée. New York & Genève: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponible à l'adresse suivantes: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_f.html.

▼**M8**

Appendice 3.1

DÉFINITIONS

Précision: étroitesse de l'accord entre les résultats de l'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de l'essai et l'un des aspects de sa «pertinence». Ce terme est souvent utilisé au sens de «concordance», pour qualifier la proportion de résultats corrects d'un essai (16).

AOP (Adverse Outcome Pathway, voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables): séquence d'événements conduisant à la survenue d'un effet indésirable *in vivo*, à partir de la structure chimique d'un produit chimique cible ou d'un groupe de produits chimiques similaires et de l'événement initiateur au niveau moléculaire (20).

Produit chimique: une: substance ou un mélange.

CV05: viabilité cellulaire 05. Concentration minimale à laquelle les produits chimiques générèrent une valeur Inh-GAPLA inférieure à 0,05.

FInSLO-LA: abréviation employée dans le rapport de validation et dans des études précédentes sur l'essai IL-8 Luc, faisant référence à Ind-IL8LA. Voir définition de Ind-IL8LA.

GAPLA: activité de la luciférase rouge *Stable Luciferase Red* (SLR) (max = 630 nm), sous régulation du promoteur de GAPDH, qui démontre la viabilité cellulaire et le nombre de cellules viables.

Danger: propriété intrinsèque d'un agent ou situation susceptible de provoquer des effets indésirables lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-) population est exposé(e) à cet agent.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment, approches intégrées en matière d'essais et d'évaluation): approche structurée utilisée dans l'identification du danger (potentiel), la caractérisation du danger (puissance) et/ou dans l'évaluation de la sécurité (potentiel de danger/puissance du danger et exposition) d'un produit chimique ou d'un groupe de produits chimiques, qui intègre de façon stratégique et pondérée toutes les données pertinentes dans le but d'informer une décision réglementaire sur le danger potentiel et/ou le risque et/ou le besoin d'effectuer d'autres tests ciblés.

II-SLR-LA: abréviation employée dans le rapport de validation et dans des études précédentes sur l'essai IL-8 Luc, faisant référence à Inh-GAPLA. Voir définition de Inh-GAPLA.

IL-8 (Interleukine-8): cytokine issue des cellules endothéliales, fibroblastes, kératinocytes, macrophages et monocytes qui provoque la chimiotaxie des neutrophiles et des lymphocytes T.

IL8LA: activité de la luciférase orange *Stable Luciferase Orange* (SLO)λ (max = 580 nm), sous régulation du promoteur de IL-8.

Ind-IL8LA: variation d'induction de nIL8LA. Calculée en divisant la valeur nIL8LA des cellules THP-G8 traitées avec les produits chimiques par la valeur nIL8LA des cellules THP-G8 non stimulées, elle représente l'induction du promoteur IL-8 par les produits chimiques.

Inh-GAPLA: inhibition de GAPLA. Calculée en divisant la valeur GAPLA des cellules THP-G8 traitées avec les produits chimiques par la valeur GAPLA des cellules THP-G8 non stimulées, elle représente la cytotoxicité des produits chimiques.

Seuil minimal d'induction (MIT): la concentration minimale à laquelle un produit chimique rempli le critère de positivité.

▼M8

Mélange: mélange ou solution constitué(e) d'au moins deux substances.

Substance mono-constituant: substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un constituant principal est présent à hauteur de 80 % minimum (m/m).

Substance multi-constituants: substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant principal est présent dans une concentration ≥ 10 % (m/m) et < 80 % (m/m). Une substance multi-constituants résulte d'un processus de fabrication. La différence entre un mélange et une substance multi-constituants est que le mélange est obtenu en associant deux substances ou plus sans réaction chimique. Une substance multi-constituants résulte d'une réaction chimique.

nIL8LA: l'activité de SLO qui reflète l'activité du promoteur IL-8 (IL8LA) normalisée par l'activité de la SLR qui reflète l'activité du promoteur GAPDH (GAPLA). Elle représente l'activité du promoteur IL-8 rapportée à la viabilité cellulaire ou au nombre de cellules.

nSLO-LA: abréviation employée dans le rapport de validation et dans des études précédentes sur l'essai IL-8 Luc, faisant référence à nIL8LA. Voir définition de nIL8LA.

Témoin positif: réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec une substance connue pour induire une réponse positive. Pour permettre d'évaluer la variabilité de la réponse du témoin positif dans le temps, l'ampleur de la réponse positive ne doit pas être excessive.

Pré-haptènes: produits chimiques devenant sensibilisants suite à une transformation abiotique.

Pro-haptènes: produits chimiques acquérant un pouvoir sensibilisant pour la peau suite à une activation enzymatique.

Pertinence: décrit la relation entre l'essai et l'effet étudié, et rend compte de l'adéquation de l'essai et de son utilité à des fins spécifiques. La pertinence indique dans quelle mesure l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) de l'essai (16).

Fiabilité: indique dans quelle mesure la mise en œuvre d'un essai peut être reproduite au cours du temps par un même laboratoire ou plusieurs laboratoires utilisant le même mode opératoire. Pour l'évaluer, on calcule la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires et la répétabilité intra-laboratoire (16).

Épreuve: consiste à tester un ou plusieurs produits chimiques parallèlement à un solvant/véhicule et à un témoin positif.

Sensibilité: proportion des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'un essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence de l'essai (16).

SLO-LA: abréviation employée dans le rapport de validation et dans des études précédentes sur l'essai IL-8 Luc, faisant référence à IL8LA. Voir définition de IL8LA.

SLR-LA: abréviation employée dans le rapport de validation et dans des études précédentes sur l'essai IL-8 Luc, faisant référence à GAPLA. Voir définition de GAPLA.

▼M8

Témoin de solvant/véhicule: échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, excepté le produit chimique d'essai, mais comprenant le solvant /véhicule utilisé. Il sert à déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique d'essai dissous ou en dispersion stable dans le même solvant/véhicule. Testé simultanément avec un témoin avec milieu, cet échantillon indique également si le solvant/véhicule interagit avec le système d'essai.

Spécificité: proportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'un essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence de l'essai (16).

Substance: élément chimique et ses composés à l'état naturel ou obtenus par un procédé de production, y compris tout additif nécessaire pour préserver leur stabilité ainsi que toute impureté produite par le procédé utilisé, mais à l'exclusion de tout solvant pouvant être extrait sans affecter la stabilité de la substance ni modifier sa composition.

Surfactant: aussi appelé agent de surface, il s'agit d'une substance, par exemple un détergent, qui réduit la tension de surface d'un liquide et lui permet ainsi de former une mousse ou de pénétrer dans des solides. Aussi appelé agent mouillant. (LD 437)

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode.

THP-G8: lignée cellulaire rapporteur IL-8 utilisée dans l'essai IL-8 Luc. La lignée monocytaire humaine THP-1 a été transfectée avec les gènes de la luciférase SLO et SLR sous le contrôle des promoteurs IL-8 et GAPDH, respectivement.

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations unies): Système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans l'objectif de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (21).

UVCB: substance de composition inconnue ou variable, produit réactionnel complexe et matériaux biologiques.

Essai valide: essai dont la pertinence et la fiabilité sont jugées satisfaisantes pour des fins spécifiques, et qui repose sur des principes scientifiquement valables. Un essai n'est jamais valide dans l'absolu, mais seulement par rapport à une fin particulière.

▼**M8**

Appendice 3.2

PRINCIPES DE MESURE DE L'ACTIVITÉ DE LA LUCIFÉRASE ET DÉTERMINATION DES COEFFICIENTS DE TRANSMISSION DES FILTRES OPTIQUES POUR SLO ET SLR

Le système d'essai à rapporteur multiple – Tripluc – peut être utilisé avec un luminomètre à microplaque doté d'un système de détection multi-couleurs avec filtre optique (Phelios AB-2350 [ATTO], ARVO [PerkinElmer] ou Tristar LB941 [Berthold], par exemple). Le filtre optique utilisé pour les mesures est un filtre passe-haut ou passe-bas 600-620 nm, ou un filtre passe-bande 600-700 nm.

Mesure de deux couleurs de luciférase avec un filtre optique.

L'exemple ci-dessous est réalisé avec un appareil Phelios AB-2350 (ATTO). Le luminomètre est équipé d'un filtre passe-haut 600 nm (R60 HOYA Co., Filtre 1) pour séparer la luminescence SLO (λmax = 580 nm) de la luminescence SLR (λmax = 630 nm).

Afin d'établir les coefficients de transmission du filtre passe-haut 600 nm, il convient d'abord d'utiliser des enzymes luciférases SLO et SLR purifiées pour i) mesurer l'intensité de la bioluminescence SLO et SLR en l'absence de filtre (F0), ii) mesurer l'intensité de bioluminescence de SLO et SLR qui traverse le filtre 1 (passe-haut 600 nm) et iii) calculer les coefficients de transmission du filtre 1 (600 nm) pour SLO et SLR présentés ci-dessous.

Transmission coefficients		Abbreviation	Definition
SLO	Filter 1 Transmission coefficients	$=\kappa O_{R60}$	The filter's transmission coefficient for the SLO
SLR	Filter 1 Transmission coefficients	κR_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLR

Si l'intensité de SLO et SLR dans l'échantillon testé sont appelées O et R, respectivement, alors i) l'intensité lumineuse sans filtre (tout optique) F0 et ii) l'intensité lumineuse transmise à travers le filtre 1 (600 nm) F1 sont décrites ci-dessous.

$F0=O+R$

$F1=\kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Ces formules peuvent être expliquées comme suit:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Ensuite, à partir des coefficients de transmission calculés (κO_{R60} et κR_{R60}) et des valeurs F0 et F1 calculées, il est possible de trouver les valeurs O et R selon le calcul ci-après:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

▼M8

Matériel et méthode de détermination du facteur de transmission

(1) *Réactifs*

Enzymes de luciferase purifiées:

Enzyme SLO purifiée lyophilisée

Enzyme SLR purifiée lyophilisée

(dans l'étude de validation, les enzymes ont été acquises auprès de GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japon, de même que la lignée cellulaire THP-G8)

Réactif:

Réactif Tripluc® Luciférase (obtenu par exemple auprès de TOYOBO Cat#MRA-301)

Milieu: pour le test de luciférase (30 ml, stocké à 2 - 8°C)

Réactif	Concentration	Concentration finale dans le milieu	Volume nécessaire
RPMI-1640	—	—	27 ml
SBF	—	10 %	3 ml

(2) *Préparation des solutions enzymatiques*

Dissoudre les enzymes purifiées lyophilisées de luciférase dans un tube en ajoutant 200 µl de 10 ~ 100 mM Tris/HCl ou Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0) supplémenté avec 10 % (m/v) glycérol, subdiviser la solution enzymatique en aliquotes en 10 µl dans des tubes jetables de 1,5 ml et stocker les tubes congelés à -80°C. Les solutions enzymatiques congelées peuvent être utilisées pendant au maximum six mois. Pour utiliser les solutions, ajouter 1 ml du milieu de l'essai de luciférase (RPMI-1640 avec 10 % SBF) à chaque tube de solution enzymatique (solution diluée) et maintenir les tubes sur la glace pour éviter toute désactivation.

(3) *Mesure de la bioluminescence*

Décongeler le réactif de l'essai de luciférase Tripluc® (Tripluc) et le maintenir à température ambiante dans un bain marie ou sur la paillasse. Allumer le luminomètre 30 minutes avant le début des mesures, afin de permettre au photomultiplicateur de se stabiliser. Transférer 100 µl de la solution enzymatique diluée dans une plaque microtitre noire 96 puits à fond plat (échantillon de référence SLO en #B1, #B2, #B3, échantillon de référence SLR en #D1, #D2, #D3). Transférer ensuite 100 µl de Tripluc préchauffé dans chaque puits de la plaque contenant la solution enzymatique diluée à l'aide d'une pipette automatique. Agiter la plaque pendant 10 minutes à température ambiante (environ 25°C) sur un agitateur de plaque. Éliminer les bulles qui pourraient se former dans les solutions. Placer la plaque dans le luminomètre pour mesurer l'activité de la luciférase. La bioluminescence est mesurée pendant 3 secondes en l'absence de filtre optique (F0) et 3 secondes avec filtre optique (F1).

Les coefficients de transmission du filtre optique sont calculés comme suit:

Coefficient de transmission (SLO (κO_{R60}))= (#B1 de F1+ #B2 de F1+ #B3 de F1) / (#B1 de F0+ #B2 de F0+ #B3 de F0)

▼**M8**

Coefficient de transmission (SLR (κR_{R60}))= (#D1 de F1+ #D2 de F1+ #D3 de F1) / (#D1 de F0+ #D2 de F0+ #D3 de F0)

Les facteurs de transmission calculés sont utilisés pour toutes les mesures réalisées avec le même luminomètre.

Contrôle de la qualité du matériel

Il convient de suivre la procédure décrite dans le mode opératoire IL-8 Luc (18).

▼**M8**

Appendice 3.3

SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE

Avant d'utiliser en routine l'essai décrit dans le présent appendice à la méthode d'essai B.71, les laboratoires doivent démontrer leurs compétences techniques en obtenant la prédiction attendue avec l'essai IL-8 Luc pour les 9 substances recommandées au tableau 1 et en obtenant des valeurs compatibles avec les plages de référence respectives d'au moins 8 substances d'épreuve sur 9 (substances retenues pour représenter l'éventail de réponses possibles au danger de sensibilisation cutanée). Les autres critères étaient la disponibilité des substances dans le commerce, ainsi que la disponibilité de données de référence *in vivo* et de données *in vitro* de grande qualité générées avec la méthode IL-8 Luc. Des données de référence publiées pour la méthode IL-8 Luc sont par ailleurs disponibles (1) (6).

Tableau 1

substances recommandées pour démontrer les compétences techniques relatives à la méthode IL-8 Luc

Substances d'épreuve compétence	N°CAS.	État	Solubilité dans le X-VIVO15 à 20 mg/ml	Prédiction *In vivo* [1]	IL-8 Luc Prédiction [2]	Plage de référence (µg/ml) [3]	
						CV_{05} [4]	IL-8 Luc MIT [5]
2,4-Dinitrochlorobenzène	97-00-7	Solide	Insoluble	Sensibilisant (extrême)	Positif	2.3-3.9	0.5-2.3
Formaldéhyde	50-00-0	Liquide	Soluble	Sensibilisant (fort)	Positif	9-30	4-9
Mercapto-2-benzothiazole	149-30-4	Solide	Insoluble	Sensibilisant (modéré)	Positif	250-290	60-250
Éthylènediamine	107-15-3	Liquide	Soluble	Sensibilisant (modéré)	Positif	500-700	0.1-0.4
Éthylèneglycol dimethacrylate	97-90-5	Liquide	Insoluble	Sensibilisant (faible)	Positif	> 2000	0.04-0.1
p-allylanisole (Estragol)	140-67-0	Liquide	Insoluble	Sensibilisant (faible)	Positif	> 2000	0.01-0.07
Sulphate de Streptomycine	3810-74-0	Solide	Soluble	Non sensibilisant	Négatif	> 2000	> 2000
Glycérol	56-81-5	Liquide	Soluble	Non sensibilisant	Négatif	> 2000	> 2000
Isopropanol	67-63-0	Liquide	Soluble	Non sensibilisant	Négatif	> 2000	> 2000

Abréviations: N°CAS = Numéro d'enregistrement au *Chemical Abstracts Service*
[1] La puissance *in vivo* est obtenue d'après les critères proposés par l'ECETOC (19).
[2] Basée sur les valeurs historiques observées (1) (6).
[3] Les valeurs CV_{05} et IL-8 Luc MIT ont été calculées à partir de l'hydrosolubilité indiquée par le logiciel EPI Suite™.
[4] CV_{05}: concentration minimale à laquelle les produits chimiques génèrent une valeur Inh-GAPLA inférieure à 0,05.
[5] MIT: concentration la plus faible à laquelle un produit chimique répond aux critères de positivité.

▼M8

Appendice 3.4

INDICES ET CRITÈRES DE JUGEMENT

nIL8LA (nSLO-LA)

Les réplicats j (j = 1 à 4) des concentrations i (i = 0 à 11) sont mesurées pour IL8LA (SLO-LA) et pour GAPLA (SLR-LA), respectivement. La valeur IL8LA normalisée, appelée nIL8LA (nSLO-LA), est définie comme suit:

$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$

Il s'agit de l'unité de mesure de base pour cet essai.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

La hausse moyenne de la valeur nIL8LA (nSLO-LA) pour le réplicat à une concentration i par rapport à la concentration 0, Ind-IL8LA, est la mesure principale de l'essai. Le calcul du ratio s'effectue grâce à la formule qui suit:

$$\mathrm{Ind-IL8LA_i} = \left\{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{ij}}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{0j}}\right\}$$

Le laboratoire principal suggère de retenir une valeur de 1,4 comme seuil de positivité pour le produit chimique d'essai. Cette valeur s'appuie sur l'étude des données historiques du laboratoire principal. L'équipe de gestion des données a ensuite utilisé cette valeur dans toutes les phases de l'étude de validation. Le principal résultat, Ind-IL8LA, est le ratio de deux moyennes arithmétiques comme détaillé dans l'équation.

Intervalle de confiance à 95 % (IC 95 %)

La précision de mesure du résultat principal est estimée grâce à l'intervalle de confiance à 95 % (IC 95 %) du ratio. Le seuil inférieur de l'IC 95 %≥1 indique que la valeur nIL8LA à l'une des concentrations i est significativement supérieure à la valeur obtenue avec le témoin de solvant. L'IC 95 % peut être calculé de plusieurs manières. Dans la présente étude, la méthode dite du théorème de Fieller a été utilisée. Selon ce théorème, l'intervalle de confiance à 95 % est calculé comme suit: où .

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}\right],$$

est le rang centile 97,5 dans la distribution centrée de Student, avec le du

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}$$

$$C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4$$

$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$

▼**M8**

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \overline{x}_0)^2$

$n_{yi} = 4$

$\overline{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \overline{y}_i)^2$

degré de liberté, où

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

La valeur Inh-GAPLA est le ratio de la valeur GAPLA moyenne (SLR-LA) pour le réplicat à une concentration i comparée à la valeur obtenue avec le témoin de solvant, calculée suivant l'équation ci-après

$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

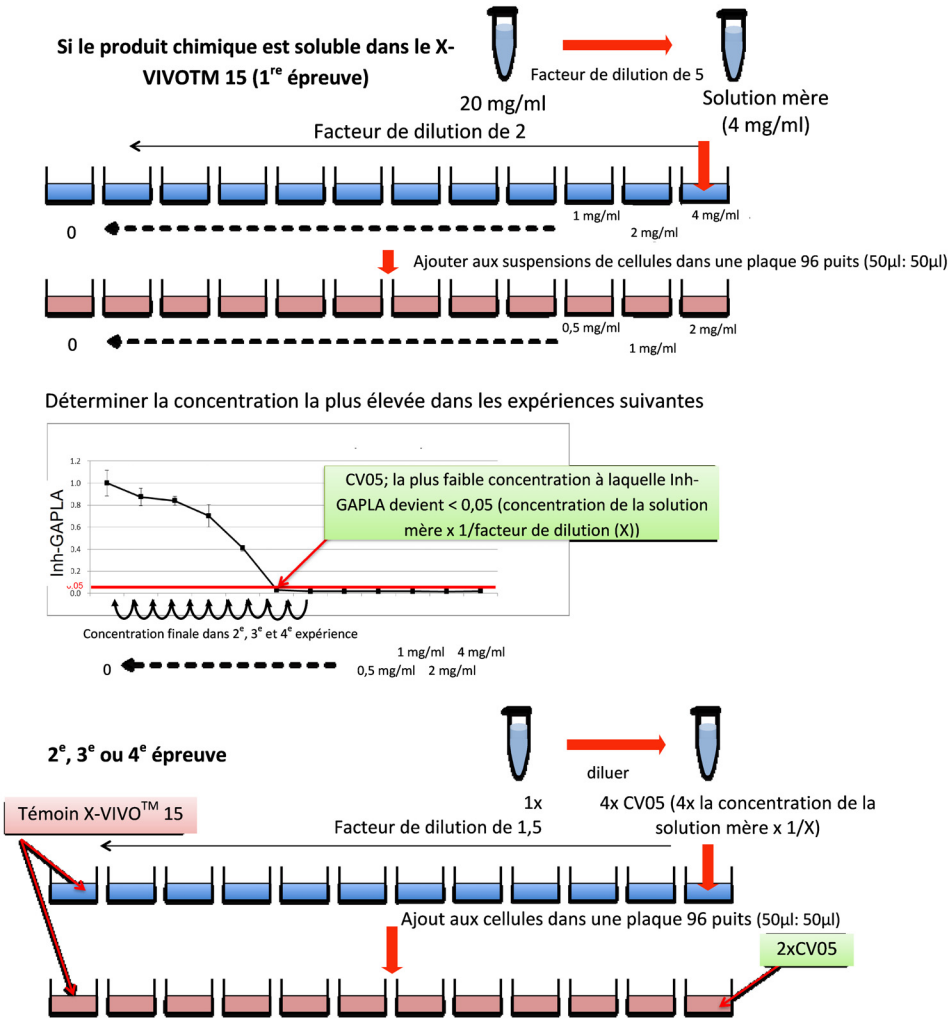
La valeur GAPLA étant placée en dénominateur du calcul de nIL8LA, si GAPLA est très faible, la variation de nIL8LA est très grande. En conséquence, les valeurs Ind-IL8LA pour une très faible valeur Inh-GAPLA (inférieure à 0,05) doivent être considérées comme peu précises.

▼**M8**

Appendice 3.5

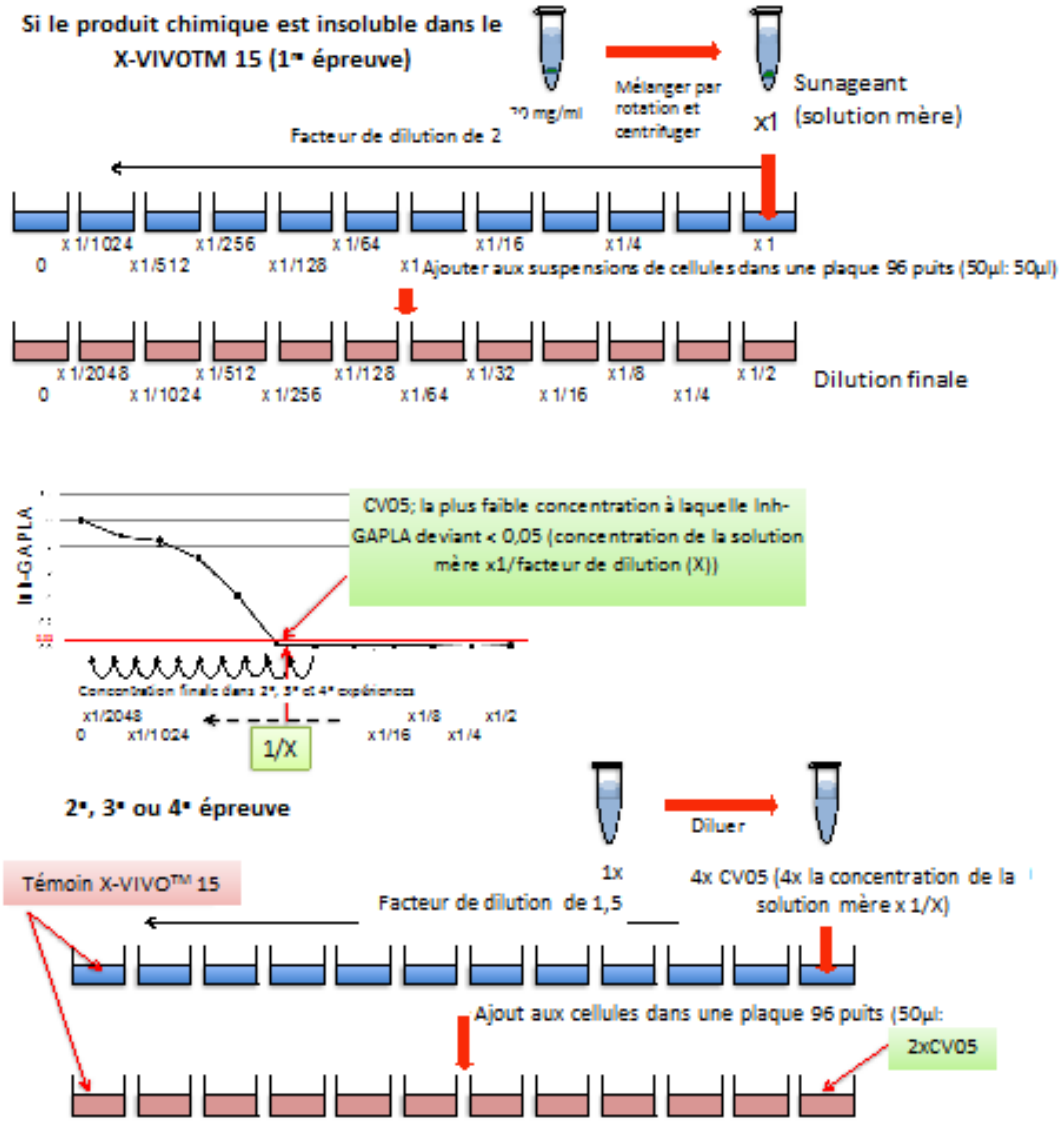
SCHÉMA DU MODE OPÉRATOIRE POUR LA DISSOLUTION DES PRODUITS CHIMIQUES DE L'ESSAI IL-8 LUC.

(a) Pour les produits chimiques dissous dans le X-VIVO™ 15 à raison de 20 mg/ml



▼**M8**

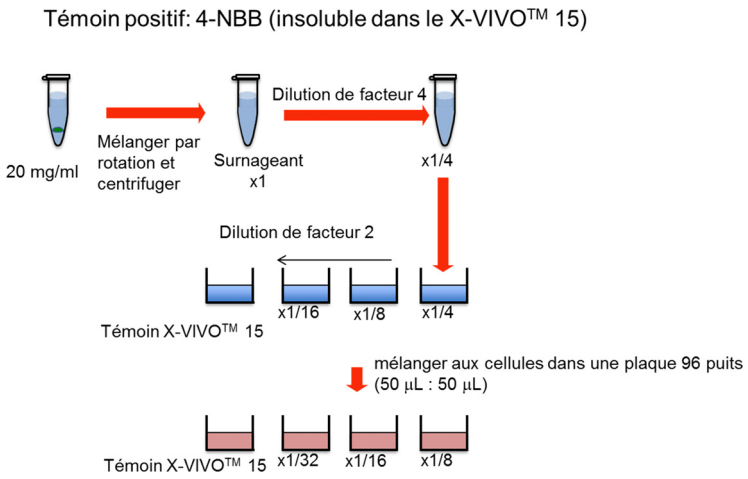
(b) Pour les produits chimiques insolubles dans le X-VIVO™ 15 à 20 mg/ml



▼**M8**

Appendice 3.6

SCHÉMA DE LA MÉTHODE DE DISSOLUTION DU 4-NBB POUR LE TÉMOIN POSITIF DE L'ESSAI IL-8 LUC



▼B

PARTIE C: MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE L'ÉCOTOXICITÉ

TABLE DES MATIÈRES

C.1. TOXICITÉ AIGUË VIS-À-VIS DES POISSONS

C.2. *DAPHNIA* SP., ESSAI D'IMMOBILISATION IMMÉDIATE

C.3. ALGUES D'EAU DOUCE ET CYANOBACTÉRIES, ESSAI D'INHIBITION DE LA CROISSANCE

C.4. DÉTERMINATION DE LA BIODÉGRADABILITÉ «FACILE»

PARTIE I. GÉNÉRALITÉS

PARTIE II. ESSAI DE DISPARITION DU COD (Méthode C.4-A)

PARTIE III. ESSAI DE SCREENING MODIFIÉ DE L'OCDE (Méthode C.4-B)

PARTIE IV. ESSAI DE DÉGAGEMENT DE CO_2 (Méthode C.4-C)

PARTIE V. ESSAI DE RESPIROMÉTRIE MANOMÉTRIQUE (Méthode C.4-D)

PARTIE VI. ESSAI EN FIOLES FERMÉES (Méthode C.4-E)

PARTIE VII. ESSAI MITI (Méthode C.4-F)

C.5 DÉGRADATION — DEMANDE BIOCHIMIQUE EN OXYGÈNE

C.6. DÉGRADATION — DEMANDE CHIMIQUE EN OXYGÈNE

C.7. DÉGRADATION — DÉGRADATION ABIOTIQUE: HYDROLYSE EN FONCTION DU PH

C.8. TOXICITÉ POUR LES VERS DE TERRE

C.9. BIODÉGRADATION — ESSAI DE ZAHN ET WELLENS

C.10. ESSAI DE SIMULATION – TRAITEMENT AÉROBIE DES EAUX USÉES: C.10-A: UNITÉS DE TRAITEMENT PAR BOUES ACTIVÉES – C.10-B: BIOFILMS

C.11. BOUE ACTIVÉE, ESSAI D'INHIBITION DE LA RESPIRATION (OXYDATION DU CARBONE ET DE L'AMMONIUM)

C.12. BIODÉGRADATION — TEST S.C.A.S. MODIFIÉ

C.13. BIOACCUMULATION CHEZ LE POISSON: EXPOSITION VIA LE MILIEU AQUATIQUE ET VIA LA VOIE ALIMENTAIRE

C.14. POISSON, ESSAI SUR LA CROISSANCE DES JUVÉNILES

C.15. POISSON, ESSAI DE TOXICITÉ À COURT TERME AUX STADES DE L'EMBRYON ET DE L'ALEVIN

C.16. ABEILLE DOMESTIQUE — ESSAI DE TOXICITÉ AIGUË PAR VOIE ORALE

C.17. ABEILLE DOMESTIQUE — ESSAI DE TOXICITÉ AIGUË PAR CONTACT

C.18. DÉTERMINATION DE L'ADSORPTION/DÉSORPTION AU MOYEN DE LA MÉTHODE PAR AGITATION

▼B

C.19.	ESTIMATION DU COEFFICIENT D'ADSORPTION (K_{OC}) SUR LE SOL ET LES BOUES D'ÉPURATION PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)
C.20.	DAPHNIA MAGNA, ESSAI DE REPRODUCTION
C.21.	MICRO-ORGANISMES DU SOL: ESSAI DE TRANSFORMATION DE L'AZOTE
C.22.	MICRO-ORGANISMES DU SOL: ESSAI DE TRANSFORMATION DU CARBONE
C.23.	TRANSFORMATION AÉROBIE ET ANAÉROBIE DANS LE SOL
C.24.	TRANSFORMATION AÉROBIE ET ANAÉROBIE DANS LES SYSTÈMES SÉDIMENTAIRES AQUATIQUES
C.25.	MINÉRALISATION AÉROBIE DANS LES EAUX SUPERFICIELLES — ESSAI DE SIMULATION DE LA BIODÉGRADATION
C.26.	LEMNA SP. ESSAI D'INHIBITION DE LA CROISSANCE
C.27.	ESSAI DE TOXICITÉ SUR LES CHIRONOMES DANS UN SYSTÈME EAU-SÉDIMENT DOPÉ
C.28.	ESSAI DE TOXICITÉ SUR LES CHIRONOMES DANS UN SYSTÈME EAU CHARGÉE-SÉDIMENT
C.29.	BIODÉGRADABILITÉ FACILE – DÉGAGEMENT DE CO_2 DANS DES FLACONS HERMÉTIQUEMENT CLOS (ESSAI DE L'ESPACE DE TÊTE AU-DESSUS DU LIQUIDE)
C.30.	BIOACCUMULATION CHEZ LES OLIGOCHÈTES TERRESTRES
C.31.	ESSAI SUR PLANTE TERRESTRE: ESSAI D'ÉMERGENCE DE PLANTULES ET DE CROISSANCE DE PLANTULES
C.32.	ESSAI DE REPRODUCTION CHEZ L'ENCHYTRÉE
C.33.	ESSAI DE REPRODUCTION CHEZ LE LOMBRIC (*EISENIA FETIDA /EISENIA ANDREI*
C.34.	DÉTERMINATION DE L'INHIBITION DE L'ACTIVITÉ DES BACTÉRIES ANAÉROBIES — RÉDUCTION DE LA PRODUCTION DE GAZ PAR UNE BOUE (D'EAUX USÉES) À DIGESTION ANAÉROBIE
C.35.	ESSAI DE TOXICITÉ SUR *LUMBRICULUS* DANS UN SYSTÈME EAU-SÉDIMENT CHARGÉ
C.36.	ESSAI DE REPRODUCTION D'UN ACARIEN PRÉDATEUR [*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*] DANS LE SOL
C.37.	ESSAI DE 21 JOURS SUR LES POISSONS: ESSAI DE DÉPISTAGE À COURT TERME DE L'ACTIVITÉ ŒSTROGÉNIQUE ET ANDROGÉNIQUE, ET DE L'INHIBITION DE L'AROMATASE
C.38.	ESSAI DE MÉTAMORPHOSE DES AMPHIBIENS
C.39.	ESSAI DE REPRODUCTION DE COLLEMBOLES DANS LE SOL

▼B

C.40. ESSAI DE TOXICITÉ SUR LE CYCLE DE VIE DES CHIRONOMES DANS UN SYSTÈME EAU-SÉDIMENT CHARGÉ OU EAU CHARGÉE-SÉDIMENT

C.41. ESSAI DE DÉVELOPPEMENT SEXUEL DES POISSONS

C.42. BIODÉGRADABILITÉ DANS L'EAU DE MER

C.43. ESSAI DE BIODÉGRADABILITÉ ANAÉROBIE DES SUBSTANCES ORGANIQUES DANS UNE BOUE DIGÉRÉE: MESURE DU DÉGAGEMENT GAZEUX

C.44. LIXIVIATION SUR DES COLONNES DE SOL

C.45. ESTIMATION DES ÉMISSIONS ISSUES DE BOIS TRAITÉ PAR UN PRODUIT DE PRÉSERVATION DANS L'ENVIRONNEMENT: MÉTHODE DE LABORATOIRE APPLICABLE AUX ARTICLES EN BOIS SANS REVÊTEMENT QUI SONT EN CONTACT AVEC DE L'EAU DOUCE OU DE L'EAU DE MER.

C.46. BIOACCUMULATION CHEZ LES OLIGOCHÈTES BENTHIQUES FOUISSEURS

C.47. POISSON, ESSAI DE TOXICITÉ AUX PREMIERS STADES DE LA VIE

C.48. ESSAI À COURT TERME DE REPRODUCTION DES POISSONS

C.49. POISSON, ESSAI DE TOXICITÉ AIGUË AU STADE EMBRYONNAIRE

C.50. ESSAI DE TOXICITÉ SUR *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* DANS UN SYSTÈME SANS SÉDIMENT

C.51. **ESSAI DE TOXICITÉ SUR *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* DANS UN SYSTÈME EAU-SÉDIMENT**

C.52. ÉTUDE ÉTENDUE DE TOXICITÉ POUR LA REPRODUCTION SUR UNE GÉNÉRATION CHEZ MÉDAKA (MEOGRT)

C.53. ESSAI DE CROISSANCE ET DE DÉVELOPPEMENT DE LARVES D'AMPHIBIENS (LAGDA)

▼B

C.1. TOXICITÉ AIGUË VIS-À-VIS DES POISSONS

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

Cet essai a pour objet de déterminer la toxicité aiguë létale d'une substance vis-à-vis des poissons en eau douce. Dans la mesure du possible, il est souhaitable de disposer d'informations sur l'hydrosolubilité, la pression de vapeur, la stabilité chimique, les constantes de dissociation et la biodégradabilité de la substance d'essai en vue du choix de la méthode d'essai la plus appropriée (statique, semi-statique ou dynamique), permettant d'assurer des concentrations constantes satisfaisantes de la substance d'essai pendant la période expérimentale.

Des informations supplémentaires (par exemple, la formule développée, le degré de pureté, la nature et le pourcentage des impuretés significatives, la présence et la quantité d'additifs, le coefficient de partage n-octanol/eau) doivent être prises en considération lors de la conception de l'essai et de l'interprétation des résultats.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

La toxicité aiguë est l'effet préjudiciable et observable provoqué dans un organisme pendant une courte durée (jours) d'exposition à une substance donnée. Dans le présent essai, la toxicité aiguë est exprimée comme la concentration létale médiane (CL_{50}), c'est-à-dire la concentration qui, dans l'eau, est responsable de la mort de 50 % des poissons d'un lot soumis aux essais pendant une période d'exposition continue qui est à indiquer.

Toutes les concentrations de la substance d'essai sont indiquées en poids par volume (mg/l). Elles peuvent également être exprimées en poids par poids (mg/kg^{-1}).

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

On pourra soumettre à essai une substance de référence afin de démontrer que, dans les conditions d'essai en laboratoire, la réponse de l'espèce utilisée pour l'essai n'a pas varié de façon significative.

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

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Un essai limite peut être effectué à 100 mg/l afin de démontrer que la CL_{50} est supérieure à cette concentration.

Les poissons sont exposés à la substance d'essai ajoutée à l'eau, dans une série de concentrations pendant une période de 96 heures. Les mortalités sont notées au moins toutes les 24 heures et les concentrations responsables de la mort de 50 % des poissons (CL_{50}) sont calculées si possible à chaque moment d'observation.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

Les critères de qualité doivent s'appliquer à l'essai limite aussi bien qu'à l'essai complet.

La mortalité des témoins ne doit pas dépasser 10 % (ou un poisson, si le nombre d'animaux utilisés pour l'essai est inférieur à 10) à la fin de l'essai.

La concentration en oxygène doit être supérieure à 60 % de la concentration saturante pendant toute la durée de l'essai.

▼B

La concentration de la substance d'essai sera maintenue au moins à 80 % de la concentration initiale pendant toute la durée de l'essai.

Pour les substances qui se dissolvent facilement dans le milieu d'essai et qui donnent des solutions stables, c'est-à-dire les substances qui ne se volatilisent pas, ne se dégradent pas, ne s'hydrolysent pas ou ne s'adsorbent pas en quantité significative, on peut considérer que la concentration initiale est la même que la concentration nominale. Il faudra prouver que la concentration a été maintenue constante pendant la durée de l'essai et que les critères de qualité ont été respectés.

Pour les substances qui sont:

i) peu solubles dans le milieu d'essai, ou

ii) susceptibles de former des émulsions ou des dispersions stables, ou

iii) instables en solution aqueuse,

la concentration initiale retenue sera la concentration mesurée dans la solution (ou si cela s'avère techniquement impossible, mesurée dans la colonne d'eau) au début de l'essai. La concentration doit être mesurée après une période d'équilibrage mais avant l'introduction des organismes d'essai.

Dans tous les cas cités ci-dessus, il y a lieu d'effectuer des mesures supplémentaires au cours de l'essai pour confirmer les concentrations réelles d'exposition et que les critères de qualité ont été respectés.

Le pH ne doit pas varier de plus d'une unité.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Trois types de systèmes peuvent être utilisés:

Essai en statique:

Essai de toxicité au cours duquel n'intervient pas de renouvellement de la solution à étudier (les solutions restent inchangées pendant toute la durée de l'essai.)

Essai en semi-statique:

Essai sans renouvellement continu de la solution, mais avec un renouvellement régulier de la solution d'essai après des périodes prolongées (par exemple toutes les 24 heures).

Essai en dynamique:

Essai de toxicité au cours duquel l'eau est constamment renouvelée dans les récipients d'essai, le produit chimique soumis à essai étant transporté par l'eau utilisée pour renouveler le milieu d'essai.

1.6.1. **Réactifs**

1.6.1.1. *Solutions de substance à tester*

Les solutions mères de concentration requise sont préparées par dissolution de la substance dans de l'eau désionisée, ou dans de l'eau répondant aux conditions fixées au point 1.6.1.2.

Les concentrations choisies pour l'essai sont préparées par dilution de la solution mère. Si l'on procède à des essais à concentrations élevées, la substance peut être dissoute directement dans l'eau de dilution.

▼B

Les substances ne doivent normalement être testées que jusqu'à la limite de solubilité. Pour certaines substances (par exemple, les substances qui sont peu hydrosolubles, ou qui ont un P_{ow} élevé, ou qui forment dans l'eau une dispersion stable plutôt qu'une véritable solution), il est possible d'utiliser une concentration supérieure à la limite de solubilité de la substance pour être sûr que la concentration soluble/stable maximale a bien été atteinte. Il est toutefois important que cette concentration ne perturbe pas, par ailleurs, les conditions de l'essai (par exemple, formation d'un film de substance à la surface de l'eau empêchant l'oxygénation de l'eau, etc.).

Dans le cas de substances à faible hydrosolubilité, on peut avoir recours à la dispersion ultrasonique, à des solvants organiques, des émulsifiants ou des dispersants, pour préparer les solutions mères ou également pour faciliter la dispersion de ces substances dans le milieu d'essai. Quand des substances auxiliaires de ce type sont utilisées, toutes les concentrations d'essai doivent contenir la même quantité de substance auxiliaire, et un lot témoin supplémentaire de poissons doit être exposé à la même concentration de substance auxiliaire que celle qui est utilisée dans les séries d'essais. La concentration de tels auxiliaires doit être limitée et ne doit en aucun cas excéder 100 mg/l dans le milieu d'essai.

L'essai doit être effectué sans ajustement du pH. S'il apparaît un changement significatif du pH, il est souhaitable de répéter l'essai avec ajustement du pH et d'en consigner les résultats. Dans ce cas, la valeur du pH de la solution mère doit être ajustée à la valeur du pH de l'eau de dilution à moins que des raisons particulières ne s'y opposent. Pour ce faire, on utilisera de préférence HCl et NaOH. Cet ajustement doit être effectué de manière que la concentration de la substance d'essai dans la solution mère ne soit pas sensiblement modifiée. Si l'ajustement entraîne une réaction chimique ou une précipitation de la substance d'essai, il faut consigner ces observations dans le procès-verbal.

1.6.1.2. *Eau d'élevage et de dilution*

On peut utiliser de l'eau potable (non contaminée par des concentrations potentiellement nocives de chlore, de métaux lourds ou d'autres substances), de l'eau naturelle de bonne qualité ou de l'eau reconstituée (voir annexe 1). On utilisera de préférence des eaux dont la dureté totale est comprise entre 10 et 250 milligrammes par litre (en $CaCO_3$), et dont le pH est compris entre 6,0 et 8,5.

1.6.2. **Appareillage**

Tout l'appareillage doit être en matériau chimiquement inerte:

— système de dilution automatique (pour essai en dynamique),

— dispositif de mesure de l'oxygène,

— équipement pour la détermination de la dureté de l'eau,

— appareillage approprié pour le contrôle de la température,

— pHmètre.

1.6.3. **Poissons soumis à l'essai**

Les poissons doivent être en bonne santé et ne présenter aucune malformation apparente.

▼B

Les espèces utilisées doivent être choisies sur la base de critères pratiques, tels que leur disponibilité toute l'année, leur facilité d'entretien, leur commodité pour l'essai, leur sensibilité relative aux produits chimiques et tous facteurs significatifs sur le plan économique, biologique ou écologique. Dans le choix des espèces de poissons, il faut également prendre en considération la nécessité de pouvoir comparer les résultats et l'harmonisation internationale existante (référence 1).

Une liste des espèces de poissons recommandées pour la réalisation de cet essai figure à l'annexe 2; le poisson zèbre et la truite arc-en-ciel sont les espèces à utiliser de préférence.

1.6.3.1. *Élevage*

Les poissons soumis à l'essai doivent provenir de préférence d'un seul et même lot, dont les individus ont la même longueur et le même âge. Ils doivent être conservés pendant au moins 12 jours dans les conditions suivantes:

charge biologique:

appropriée au système utilisé (avec recirculation ou en dynamique) et aux espèces de poissons,

eau:

voir point 1.6.1.2,

lumière:

photopériode de 12 à 16 heures par jour,

concentration en oxygène dissous:

au moins 80 % de la saturation en air,

alimentation:

quotidienne ou trois fois par semaine, avec arrêt de 24 heures avant le début de l'essai.

1.6.3.2. *Mortalité*

Après une période d'adaptation de 48 heures, enregistrer les morts et appliquer les critères suivants:

— mortalité en 7 jours supérieure à 10 % de la population:

rejet de l'ensemble du lot,

— mortalité en 7 jours comprise entre 5 et 10 % de la population:

prolonger la période d'observation pendant 7 jours.

Si l'on ne constate aucun autre cas de mortalité, le lot est acceptable, sinon, il doit être rejeté,

— mortalité en 7 jours inférieure à 5 % de la population:

acceptation du lot.

1.6.4. **Adaptation**

Les poissons doivent être maintenus pendant au moins 7 jours avant leur utilisation dans les mêmes conditions que celles de l'essai (eau et température).

▼B

1.6.5. **Mode opératoire**

Avant l'essai définitif, on pourra procéder à un essai visant à déterminer l'intervalle de concentrations à utiliser lors de l'essai définitif.

Procéder, en plus de la série d'essais, à un essai témoin sans substance à étudier et, le cas échéant, à un essai témoin contenant le produit auxiliaire.

En fonction des propriétés physiques et chimiques de la substance à étudier, on choisira une méthode appropriée statique, semi-statique ou dynamique, qui réponde aux critères de qualité.

Les poissons sont exposés à la substance d'essai dans les conditions suivantes:

— durée: 96 heures,

— nombre d'animaux: au moins 7 par concentration,

— récipients: d'une capacité appropriée, en fonction de la charge biologique recommandée,

— charge biologique: charge maximale recommandée pour l'essai statique ou semi-statique: 1,0 gramme par litre; pour les essais dynamiques, une charge plus élevée peut être acceptable,

— concentrations d'essai: au moins cinq concentrations qui diffèrent d'un facteur constant n'excédant pas 2,2 et couvrent, dans la mesure du possible, l'intervalle de mortalité de 0 à 100 %,

— eau: voir point 1.6.1.2,

— lumière: photopériode de 12 à 16 heures par jour,

— température: convenant à l'espèce choisie (annexe 2), mais constante à ± 1 ^{o}C près, quel que soit le système d'essai,

— concentration en oxygène dissous: au moins 60 % de la concentration saturante en air à la température choisie,

— nourriture: aucune.

Les poissons sont examinés après les 2 à 4 premières heures et au moins à intervalles de 24 heures. Ils sont considérés comme morts si le fait de toucher le pédoncule caudal ne produit aucune réaction et si aucun mouvement respiratoire n'est visible. Les poissons morts sont éliminés à chaque observation et les mortalités enregistrées. Les anomalies visibles (par exemple, perte d'équilibre, perturbations au niveau de la nage, des fonctions respiratoires, de la pigmentation, etc.) seront consignées.

Les mesures du pH, de l'oxygène dissous et de la température doivent être effectuées quotidiennement.

Essai limite

Un essai limite peut être effectué à une concentration de 100 mg/l, en suivant les procédures décrites dans cette méthode d'essai, afin de montrer que la CL_{50} est supérieure à cette concentration.

Si la nature de la substance est telle qu'il est impossible d'obtenir une concentration de 100 mg/l dans l'eau d'essai, l'essai limite doit être effectué à une concentration égale à la solubilité de la substance (ou à la concentration maximale formant une dispersion stable) dans le milieu utilisé (voir également le point 1.6.1.1).

▼B

L'essai limite doit être effectué avec 7 à 10 poissons, et avec un nombre identique dans le(s) lot(s) témoin(s). (Selon la théorie binomiale, lorsque l'on utilise 10 poissons avec une mortalité nulle, il y a 99,9 % de chance que la CL_{50} soit supérieure à la concentration utilisée dans l'essai limite. Avec 7, 8 ou 9 poissons et une mortalité nulle, il y a 99 % de chance que la CL_{50} soit supérieure à la concentration utilisée.)

En cas de mortalité, il convient d'effectuer un essai complet. Si des effets sublétaux sont observés, ceux-ci doivent être consignés.

2. **ÉVALUATION DES DONNÉES**

Reporter, sur un papier log-probit, le pourcentage de mortalité pour chaque période d'exposition recommandée (24, 48, 72 et 96 heures) en fonction de la concentration.

Pour chaque temps d'observation, estimer, lorsque cela est possible, la CL_{50} et l'intervalle de confiance ($p = 0,05$) par les méthodes classiques; les valeurs obtenues doivent être arrondies à un ou deux (maximum) chiffres significatifs (exemples de nombres arrondis à deux chiffres: 170 pour 173,5; 0,13 pour 0,127; 1,2 pour 1,21).

Dans le cas où la pente de la courbe de pourcentage en fonction de la concentration est trop forte pour permettre de calculer la CL_{50}, il suffit de procéder à une estimation graphique de cette valeur.

Lorsque deux concentrations consécutives dans un rapport de 2,2 donnent 0 et 100 % de mortalité, ces deux valeurs suffisent à indiquer l'intervalle dans lequel se situe la CL_{50}.

Si l'on constate que la stabilité ou l'homogénéité de la substance d'essai ne peut pas être maintenue, cette observation doit être mentionnée et les résultats seront interprétés avec prudence.

3. **RÉSULTATS**

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

— des informations sur les poissons soumis à essai (nom scientifique, souche, fournisseur, tout prétraitement, taille et nombre utilisé pour chaque concentration d'essai),

— origine et principales caractéristiques de l'eau de dilution (pH, dureté, température),

— dans le cas de substances faiblement hydrosolubles, méthode de préparation de la solution mère et de la solution d'essai,

— concentration de tout produit auxiliaire,

— liste des concentrations utilisées et toute information disponible sur la stabilité de la substance d'essai dans la solution d'essai à ces concentrations,

— si on procède à des analyses chimiques, méthodes utilisées et résultats,

— éventuellement, résultats de l'essai limite,

— motifs du choix et description détaillée de la méthode utilisée (par exemple système statique, semi-statique, taux d'administration, taux de renouvellement, aération ou non, charge en poisson, etc.),

▼B

— description du matériel d'essai,

— régime d'éclairement,

— concentration en oxygène dissous, pH et température des solutions d'essai toutes les 24 heures,

— preuves que les critères de qualité ont été respectés,

— tableau contenant la mortalité cumulée pour chaque concentration et pour le témoin (et, au besoin, le témoin contenant la substance auxiliaire) à chaque temps d'observation recommandé,

— représentation graphique du pourcentage de mortalité en fonction de la concentration à la fin de l'essai,

— si possible, valeurs de la CL_{50} pour chacun des temps d'observation recommandés (avec l'intervalle de confiance à 95 %),

— méthodes statistiques employées pour déterminer les valeurs de la CL_{50},

— si une substance de référence est utilisée, les résultats obtenus,

— la concentration d'essai la plus élevée qui ne cause pas de mortalité pendant la durée de l'essai,

— la concentration d'essai la plus basse qui cause une mortalité de 100 % des poissons pendant la durée de l'essai.

4. **RÉFÉRENCES**

(1) OCDE, Paris, 1981, ligne directrice n° 203, décision du Conseil C(81) 30 final et mises à jours.

(2) AFNOR — NFT 90-303, juin 1985 — Détermination de la toxicité aiguë d'une substance vis-à-vis du *Brachydanio rerio* — Méthode statique et dynamique.

(3) AFNOR — NFT 90-305, juin 1985 — Détermination de la toxicité aiguë d'une substance vis-à-vis du *Salmo gairdneri* — Méthode statique et dynamique.

(4) ISO 7346/1/2 and/3 — Water Quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan — *Teleostei, Cyprinidae).* Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

(5) Eidgenôssisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden — Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L(15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506 — Water — Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata,* 1980.

(9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

(13) Commission of the European Communities, Inter-Laboratory test programme concerning the study of the ecotoxiciry of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die Ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm. and Exp. Therap., 1949, vol 96, p. 99.

(16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K, 1978.

(17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, p. 793-821.

(18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, p. 3-32.

(19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hasard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials. ASTM STP 634, 1977, p. 65-84.

(20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W.A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

▼B

Annexe 1

Eau reconstituée

Exemple d'eau de dilution appropriée

Tous les produits chimiques doivent être de qualité analytique.

L'eau doit être une eau distillée de bonne qualité, ou de l'eau désionisée d'une conductivité inférieure à 5 µScm-1.

L'appareillage pour la distillation de l'eau ne doit contenir aucun élément en cuivre.

Solutions mères

$CaCl_2$. 2 H_2O (chlorure de calcium dihydraté): dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre	11,76 g
$MgSO_4$. 7 H_2O (sulfate de magnésium heptahydraté): dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre	4,93 g
$NaHCO_3$ (hydrogénocarbonate de sodium): dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre	2,59 g
KCI (chlorure de potassium): dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre	0,23 g

Eau de dilution reconstituée

Mélanger 25 ml de chacune des quatre solutions mères et compléter à 1 litre avec de l'eau.

Aérer jusqu'à saturation en oxygène dissous 1qy.

Le pH doit être de 7,8 ± 0,2.

Si nécessaire, ajuster le pH avec NaOH (hydroxyde de sodium) ou HC1 (acide chlorhydrique).

L'eau de dilution ainsi préparée est laissée au repos pendant environ 12 heures et ne doit pas être aérée ultérieurement.

La somme des ions Ca et Mg dans cette solution est égale à 2,5 mmol/l. Le rapport des ions Ca:Mg est de 4:1, celui des ions Na:K de 10:1. L'alcalinité totale de cette solution est égale à 0,8 mmol/l.

Les déviations éventuelles dans la préparation de l'eau de dilution ne doivent pas modifier la composition ou les propriétés de cette eau.

▼B

Annexe 2

Espèces de poissons recommandées pour l'essai

Espèces recommandées	Intervalles des températures d'essai recommandé (°C)	Longueur totale recommandée de l'animal soumis à l'essai (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Danio zébré	20 à 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Tête de boule	20 à 24	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae} (Linnaeus 1758) Carpe commune	20 à 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliiae) Cyprinodonti-dae (Tomminck et Schlegel 1850) Nedaka	20 à 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20 à 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchi-dae) Rafinesque Linnaeus 1758) Crapet arlequin	20 à 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmoni-dae) (Walbaum 1988) Truite arc-en-ciel	12 à 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Ide mélanote	20 à 24	6,0 ± 2,0

Approvisionnement

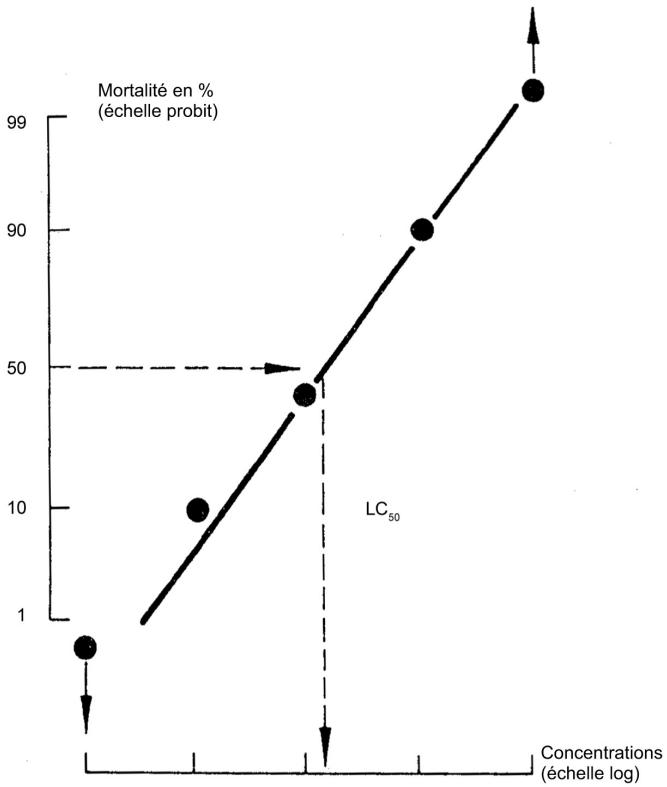
Les poissons mentionnés ci-dessus sont faciles à élever et/ou largement disponibles pendant toute l'année. Ils peuvent se reproduire et se développer soit dans des exploitations piscicoles, soit en laboratoire, dans des conditions sanitaires contrôlées. L'animal soumis à essai doit être sain et d'origine connue. Ces poissons sont disponibles partout dans le monde.

▼B

Annexe 3

Exemple de courbe de pourcentage de mortalité en fonction de la concentration

Exemple de détermination de la CL_{50} sur papier log-probit



▼B

C.2. *DAPHNIA* SP., ESSAI D'IMMOBILISATION IMMÉDIATE

1. MÉTHODE

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 202 (2004) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

Cette méthode décrit un essai de toxicité aiguë visant à évaluer les effets des substances chimiques sur des daphnies. Les méthodes d'essai existantes ont été utilisées dans toute la mesure du possible (1) (2) (3).

1.2. DÉFINITIONS

Les définitions suivantes sont utilisées aux fins de la présente méthode:

CE_{50}: estimation de la concentration capable d'immobiliser 50 % des daphnies après une période d'exposition définie. Si une autre définition est utilisée, elle doit être indiquée avec sa référence.

Immobilisation: les animaux incapables de nager au bout de 15 secondes après agitation douce du récipient utilisé pour l'essai sont considérés comme immobiles (même s'ils sont toujours capables de bouger leurs antennes).

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

De jeunes daphnies, âgées de moins de 24 heures au début de l'essai, sont exposées à la substance d'essai à différentes concentrations pendant une période de 48 heures. L'immobilisation est enregistrée à 24 et à 48 heures, puis comparée à des valeurs de contrôle. Les résultats sont analysés pour calculer la CE_{50} à 48 heures (voir point 1.2 pour les définitions). La détermination de la CE_{50} à 24 heures est facultative.

1.4. INFORMATION CONCERNANT LA SUBSTANCE D'ESSAI

La solubilité dans l'eau et la pression de vapeur de la substance d'essai doivent être connues. De même, il faut disposer d'une méthode d'analyse fiable pour doser la substance dans les solutions d'essai dont le rendement de récupération et la limite de détermination sont connus. Les informations utiles comprennent la formule structurale, la pureté de la substance, la stabilité dans l'eau ou à la lumière, le P_{oe} et les résultats d'un essai de biodégradabilité immédiate (voir méthode C.4).

Remarque: Un document d'orientation (4) fournit des indications pour les substances qu'il est difficile de tester à cause de leurs propriétés physico-chimiques.

1.5. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Il est possible de déterminer la CE_{50} d'une substance de référence, de manière à s'assurer que les conditions d'essai sont fiables. Les toxiques utilisés dans les essais tournants internationaux (1) (5) sont recommandés à cet effet ([1]). Les essais avec une substance de référence doivent être effectués de préférence tous les mois et au moins deux fois par an.

([1]) Les résultats de ces essais interlaboratoires, ainsi qu'un corrigendum technique à l'ISO 6341, donnent une CE_{50} 24 h du dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) comprise entre 0,6 mg/l et 1,7 mg/l.

▼B

1.6. CRITÈRES DE QUALITÉ

Pour qu'un essai soit valide, les critères de performance suivants s'appliquent:

— pas plus de 10 % des daphnies ne doivent être immobilisées dans le groupe témoin, y compris le témoin contenant l'agent solubilisant,

— la concentration d'oxygène dissous à la fin de l'essai doit être ≥ 3 mg/l dans les récipients d'essai et les récipients témoins.

Remarque: Pour le premier critère, pas plus de 10 % des daphnies du témoin ne doivent être immobilisées ou montrer d'autres signes de défaillance ou de stress, tels qu'une décoloration ou un comportement inhabituel (piégées à la surface de l'eau, par exemple).

1.7. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.7.1. **Appareillage**

Les récipients et autres équipements qui sont amenés à entrer en contact avec les solutions d'essai doivent être intégralement en verre, ou en un autre matériau chimiquement inerte. Les récipients d'essai sont le plus souvent des éprouvettes ou des béchers en verre. Avant chaque usage, ils doivent être nettoyés selon les procédures de laboratoire standard. Afin de réduire la déperdition d'eau par évaporation et de prévenir l'entrée de poussière dans les solutions, les récipients d'essai doivent être couverts. Les essais sur les substances volatiles doivent être réalisés dans des récipients complètement remplis et fermés, suffisamment grands pour éviter que la concentration d'oxygène ne soit trop faible ou ne devienne un facteur limitant (voir point 1.6 et premier paragraphe du point 1.8.3).

Par ailleurs, tout ou partie des équipements suivants est nécessaire: un appareil pour mesurer la concentration de l'oxygène (à l'aide d'une microélectrode ou d'un autre dispositif destiné à mesurer l'oxygène dissous dans des échantillons de faible volume); un pH-mètre; un thermostat adéquat; un appareil pour déterminer la concentration de carbone organique totale (COT); un appareil pour déterminer la demande chimique en oxygène (DCO); un appareil pour déterminer la dureté de l'eau, etc.

1.7.2. **Organisme d'essai**

L'espèce à utiliser de préférence dans cet essai est *Daphnia magna* Straus, mais d'autres espèces de *Daphnia* peuvent aussi être utilisées *(Daphnia pulex,* par exemple). Au début de l'essai, les animaux doivent être âgés de 24 heures au maximum, et, pour réduire la variabilité, il est fortement recommandé qu'ils ne proviennent pas d'une première génération de descendants. Ils doivent être issus d'un lot sain (c'est-à-dire qui ne présente pas de signes de stress, tels qu'une mortalité élevée, la présence de mâles et d'éphippies, un retard dans la production des premiers descendants, des animaux décolorés, etc.). Tous les organismes utilisés dans un essai donné doivent provenir de cultures établies à partir d'un même lot de daphnies. Le lot d'animaux doit être maintenu dans des conditions de culture (lumière, température, milieu) semblables à celles qui seront appliquées au cours de l'essai. Si le milieu utilisé dans l'essai est différent de celui où sont normalement élevées les daphnies, il convient de leur laisser une période d'acclimatation avant l'essai. En l'occurrence, il convient de les maintenir dans de l'eau de dilution à la température de l'essai pendant au moins 48 heures avant le début de l'essai.

▼B

1.7.3. **Eau d'acclimatation et de dilution**

On peut utiliser, comme eau d'acclimatation et de dilution, de l'eau naturelle (eau de surface ou eau souterraine), de l'eau reconstituée ou de l'eau du robinet déchlorée, du moment que les daphnies y survivent sans montrer de signes de stress pendant toute la durée de l'élevage, de l'acclimatation et de l'essai. Toute eau conforme aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable données dans la liste de l'annexe 1 convient pour cet essai. Sa qualité doit rester constante tout au long de l'essai. Les eaux reconstituées peuvent être composées d'eau distillée ou désionisée auxquelles on ajoute certaines quantités spécifiques de réactifs de qualité pour analyse. Des exemples d'eau reconstituée sont donnés dans les documents (1) (6) et dans l'annexe 2. Il convient de noter que les milieux contenant des agents chélatants connus, tels que les milieux M4 et M7 présentés dans l'annexe 2, doivent être évités pour les essais de substances contenant des métaux. Le pH doit être compris entre 6 et 9. Une dureté comprise entre 140 et 250 mg/l (en $CaCO_3$) est recommandée pour les *Daphnia magna,* mais des duretés inférieures conviennent également pour d'autres espèces de *Daphnia.* L'eau de dilution peut être aérée avant utilisation dans l'essai, de façon que la concentration de l'oxygène dissous atteigne la saturation.

Lorsque de l'eau naturelle est utilisée, les paramètres de sa qualité doivent être mesurés au moins deux fois par an, ou chaque fois que ses caractéristiques sont susceptibles d'avoir été significativement modifiées (voir point précédent et annexe 1). Les métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, par exemple) doivent être mesurés. Si de l'eau du robinet déchlorée est utilisée, il est souhaitable de procéder chaque jour à une analyse de sa teneur en chlore. Si l'eau de dilution provient d'une eau souterraine ou d'une eau de surface, sa conductivité et son carbone organique total (COT) ou sa demande chimique en oxygène (DCO) doivent être mesurés.

1.7.4. **Solutions d'essai**

Les solutions d'essai sont généralement amenées à la concentration voulue par dilution d'une solution mère. De préférence, les solutions mères doivent être préparées par dissolution de la substance d'essai dans l'eau de dilution. Le recours à des solvants, émulsifiants ou dispersants doit être évité dans toute la mesure du possible. Néanmoins, ces additifs sont parfois nécessaires pour obtenir une solution mère à la concentration voulue. Le document guide (4) donne des informations sur le choix des solvants, émulsifiants et dispersants appropriés. En tout cas, la substance d'essai dans la solution d'essai ne doit pas excéder sa limite de solubilité dans l'eau de dilution.

L'essai doit être mené sans ajustement du pH. Si le pH ne reste pas dans la plage comprise entre 6 et 9, alors il convient de procéder à un deuxième essai, en ajustant le pH de la solution mère à celui de l'eau de dilution avant d'ajouter la substance d'essai. Lors de l'ajustement du pH, il faut que la concentration de la solution mère ne soit quasiment pas modifiée, ni qu'aucune réaction chimique, ni précipitation de la substance d'essai ne soit provoquée. De préférence, il convient d'employer du HCl et du NaOH.

▼B

1.8. PROCÉDURE

1.8.1. **Conditions d'exposition**

1.8.1.1. *Témoins et groupes d'essai*

On remplit les récipients d'essai avec les volumes voulus d'eau de dilution et de solutions de la substance d'essai. Le rapport air/volume d'eau à l'intérieur des récipients doit être identique pour les groupes témoins et les groupes d'essai. On place ensuite les daphnies dans les récipients. Il faut utiliser, pour chaque concentration d'essai et pour les témoins, au moins 20 animaux, répartis de préférence en quatre groupes de cinq animaux. Un volume d'au moins 2 ml de solution d'essai doit être prévu pour chaque animal (soit un volume de 10 ml pour cinq daphnies par récipient). Si la concentration de la substance d'essai n'est pas stable, un système de renouvellement semi-statique ou continu peut être utilisé pour l'essai.

Parallèlement aux séries traitées, il faut tester une série de témoins de l'eau de dilution et, le cas échéant, une série de témoins contenant l'agent solubilisant (solvant) en quantité utilisée dans les séries traitées.

1.8.1.2. *Concentrations d'essai*

À moins qu'une information ne soit déjà disponible sur la toxicité de la substance d'essai, un essai peut le cas échéant être mené pour déterminer la plage des concentrations de l'essai définitif. À cette fin, les daphnies sont exposées à une série de concentrations de la substance d'essai largement espacées. Cinq daphnies sont exposées à chaque concentration pendant 48 heures ou moins. Aucun essai identique n'est nécessaire. La période d'exposition peut être raccourcie (24 heures ou moins, par exemple) s'il est possible d'obtenir plus rapidement les données voulues.

Il faut utiliser au moins cinq concentrations formant une série géométrique de concentrations successives séparées, de préférence, par un facteur inférieur ou égal à 2,2. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. De préférence, la concentration la plus élevée doit provoquer 100 % d'immobilisation, et la moins élevée ne doit donner lieu à aucun effet observable.

1.8.1.3. *Conditions d'incubation*

La température doit être comprise entre 18 et 22 ^{o}C, et, pour chaque essai, elle doit être constante à ± 1 ^{o}C. Une alternance de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité est recommandée. Une obscurité complète est également acceptable, en particulier pour les substances d'essai instables à la lumière.

Les récipients d'essai ne doivent pas être aérés durant l'essai. L'essai est mené sans ajustement du pH. Les daphnies ne doivent pas être nourries pendant l'essai.

1.8.1.4. *Durée*

La durée de l'essai est de 48 heures.

1.8.2. **Observations**

À échéances de 24 et 48 heures après le début de l'essai, la présence de daphnies immobiles doit être contrôlée dans chaque récipient d'essai (voir définitions au point 1.2). Outre l'immobilité, tout comportement ou signe anormal doit être signalé.

▼B

1.8.3. **Mesures analytiques**

L'oxygène dissous et le pH sont mesurés au début et à la fin de l'essai dans les récipients témoins et dans ceux contenant la concentration de la substance d'essai la plus élevée. La concentration de l'oxygène dissous dans les témoins doit être conforme au critère de validité (voir le point 1.6). Normalement, le pH ne doit pas varier de plus de 1,5 unité au cours d'un essai. En règle générale, on mesure la température dans les récipients témoins ou la température ambiante, et de préférence il y a lieu de l'enregistrer en continu au cours de l'essai ou, au minimum, au début et à la fin de l'essai.

La concentration de la substance d'essai doit être mesurée, au minimum, dans les récipients contenant la concentration la plus élevée et la concentration la plus basse, au début et à la fin de l'essai (4). Il est recommandé de fonder les résultats sur les concentrations mesurées. Toutefois, si l'on peut démontrer de façon suffisamment convaincante que la concentration de la substance d'essai a été maintenue tout au long de l'essai de manière satisfaisante dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale ou de la concentration initiale mesurée, alors les résultats peuvent être fondés sur les valeurs nominales ou les valeurs initiales mesurées.

1.9. ESSAI LIMITE

Sur la base du mode opératoire décrit dans la présente méthode, un essai limite peut être conduit à 100 mg/l de substance d'essai ou jusqu'à sa limite de solubilité dans le milieu d'essai (selon la valeur la plus basse), de façon à démonter que la CE_{50} est supérieure à cette concentration. L'essai limite doit être mené sur 20 daphnies (de préférence réparties en quatre groupes de cinq), avec un nombre équivalent d'animaux dans les récipients témoins. Si des daphnies sont immobilisées, il y a lieu de mener une étude complète. Tout comportement anormal observé doit être enregistré.

2. **RÉSULTATS**

Les résultats doivent être synthétisés dans des tableaux mettant en évidence, pour chaque groupe d'essai et chaque témoin, le nombre de daphnies utilisées et l'immobilisation à chaque observation. En outre, une représentation graphique doit montrer les pourcentages immobilisés à 24 et 48 heures par concentration d'essai. Les résultats sont analysés au moyen des méthodes statistiques appropriées (analyse probit, par exemple) permettant de calculer les pentes des courbes et la CE_{50} avec des limites de confiance de 95 % (p = 0,05) (7) (8).

Lorsque les données obtenues ne se prêtent pas au calcul de la CE_{50} par les méthodes standard, on doit utiliser la concentration la plus élevée qui ne donne aucune immobilisation et la concentration la plus faible qui donne 100 % d'immobilisation pour en déduire une valeur approximative de la CE_{50} (en prenant la moyenne géométrique de ces deux concentrations).

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit mentionner les informations suivantes:

Substance d'essai:

— état physique et propriétés physico-chimiques pertinentes,

▼B

— données permettant l'identification chimique, y compris la pureté.

Espèce d'essai:

— source et espèce de *Daphnia,* fournisseur (s'il est connu) et conditions de culture appliquées (notamment source, type et quantités de nourriture, fréquence de l'alimentation).

Conditions d'essai:

— description des récipients d'essai: type et volume des récipients, volume de la solution, nombre de daphnies par récipient, nombre de récipients d'essai (essais identiques) par concentration,

— méthodes de préparation des solutions mères et d'essai, et notamment utilisation éventuelle de tout solvant ou agent dispersant, et concentrations utilisées,

— détails concernant l'eau de dilution: source et caractéristiques (pH, dureté, rapport Ca/Mg, rapport Na/K, alcalinité, conductivité, etc.); le cas échéant, composition de l'eau reconstituée,

— conditions d'incubation: température, intensité et périodicité de la lumière, oxygène dissous, pH, etc.

Résultats:

— nombre et pourcentage de daphnies immobilisées ou ayant manifesté un effet adverse quelconque (y compris un comportement anormal) parmi les témoins et les groupes traités à chaque période d'observation, et une description de la nature des effets constatés,

— résultats et date de l'essai effectué avec une substance de référence, le cas échéant,

— concentrations d'essai nominales et résultat de toutes les analyses visant à déterminer la concentration de la substance d'essai dans les récipients d'essai; l'efficacité de la méthode de récupération et la limite de détermination doivent également être précisées,

— toutes les mesures physico-chimiques (température, pH et oxygène dissous) effectuées au cours de l'essai,

— CE_{50} à 48 heures (immobilisation) avec les intervalles de confiance et les graphiques du modèle utilisé pour le calcul, les pentes des courbes dose-effet et leur erreur standard; procédures statistiques utilisées pour déterminer la CE_{50} (ces informations doivent aussi être précisées pour l'immobilisation à 24 heures lorsque les mesures ont été effectuées),

— explication de tout écart par rapport à la méthode d'essai, et conséquences éventuelles sur les résultats de l'essai.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(21) ISO 6341 (1996). Qualité de l'eau — Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Essai de toxicité aiguë. Troisième édition, 1996.

(22) EPA OPPTS 850.1010 (1996). Ecological Effects Test Guidelines — Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

(23) Environnement Canada (1996). Méthode d'essai biologique. Essai de létalité aiguë sur *Daphnia* spp. EPS 1/RM/1 1. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

(24) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No 23. Paris 2000.

(25) Commission des Communautés européennes. Étude D8369 (1979). Programme d'essais interlaboratoires concernant l'étude de l'écotoxicité d'une substance chimique vis-à-vis de la *Daphnia.*

(26) OCDE, ligne directrice pour les essais de produits chimiques. Ligne directrice 211: *Daphnia magna,* essai de reproduction, adoptée en septembre 1998.

(27) Stephan, C.E. (1977). Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 — American Society for Testing and Materials, p. 65-84.

(28) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

Annexe 1

QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ACCEPTABLE

Substance	Concentration
Particules	<20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Chlore résiduel	<10 µg/l
Total des pesticides organophosphorés	<50 ng/l
Total des pesticides organochlorés plus biphényles polychlorés	<50 ng/l
Chlore organique total	<25 ng/l

▼B

Annexe 2

EXEMPLES D'EAU D'ESSAI RECONSTITUÉE ACCEPTABLE

Eau d'essai ISO (1)

Solutions mères (substance unique)		Pour préparer l'eau reconstituée, ajouter les volumes suivants de solutions mères à 1 litre d'eau (*)
Substance	Quantité ajoutée à 1 litre d'eau (*)	
Chlorure de calcium $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Sulfate de magnésium $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
Bicarbonate de sodium $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Chlorure de potassium KCl	0,23 g	25 ml

(*) Eau de pureté adéquate, par exemple, eau désionisée, distillée ou obtenue par osmose inverse, de conductivité de préférence inférieure à 10 $\mu S.cm^{-1}$.

Milieux Elendt M7 et M4

Acclimatation aux milieux Elendt M4 et M7

Certains laboratoires ont rencontré des difficultés pour transférer directement les *Daphnia* dans les milieux M4 et M7. Ils sont toutefois parvenus à un certain résultat en les acclimatant progressivement, c'est-à-dire en les transférant de leur milieu vers un milieu à 30 % d'Elendt, puis à 60 % d'Elendt et enfin à 100 % d'Elendt. Les périodes d'acclimatation peuvent prendre jusqu'à un mois.

Préparation

Éléments en traces

Différentes solutions mères (I), contenant chacune une seule substance en traces, sont tout d'abord préparées avec une eau d'une pureté adéquate, par exemple de l'eau désionisée, distillée ou obtenue par osmose inverse. À partir de ces différentes solutions mères (I), on prépare une deuxième solution mère unique (II) renfermant toutes les substances en traces (solution combinée), à savoir:

Solution(s) mère(s) I (substance unique)	Quantité ajoutée à l'eau (mg/l)	Concentration (par rapport au milieu M4)	Pour préparer la solution mère combinée II, ajouter la quantité suivante de solution mère I à l'eau (ml/l)	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20 000 fois	1,0	0,25
$MnCl_2.4H_2O$	7 210	20 000 fois	1,0	0,25
LiC1	6 120	20 000 fois	1,0	0,25

▼B

Solution(s) mère(s) I (substance unique)	Quantité ajoutée à l'eau (mg/l)	Concentration (par rapport au milieu M4)	Pour préparer la solution mère combinée II, ajouter la quantité suivante de solution mère I à l'eau (ml/l)	
			M4	M7
RbC1	1 420	20 000 fois	1,0	0,25
$SrCl_2.6H_2O$	3 040	20 000 fois	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 fois	1,0	0,25
$Na_2\ MoO_4.2H_2O$	1 230	20 000 fois	1,0	0,25
$CuCl_2.2H_2O$	335	20 000 fois	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000 fois	1,0	1,0
$CoCl_2.6H_2O$	200	20 000 fois	1,0	1,0
KI	65	20 000 fois	1,0	1,0
$Na_2\ SeO_3$	43,8	20 000 fois	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000 fois	1,0	1,0
Na_2 EDTA.$2H_2O$	5 000	2 000 fois	_	_
$FeSO_4.7H_2O$	1 991	2 000 fois	_	_

Les solutions de Na_2EDTA et de $FeSO_4$ sont préparées séparément, puis mélangées et immédiatement autoclavées.

Cela donne:

2 1 solution Fe-EDT		1 000 fois	20,0	5,0

Milieux M4 et M7

Les milieux M4 et M7 sont préparés à partir de la solution mère II, de macronutriments et de vitamines, de la façon suivante:

	Quantité ajoutée à l'eau (mg/l)	Concentration (par rapport au milieu M4)	Quantité de solution mère II ajoutée pour préparer le milieu (ml/l)	
			M4	M7
Solution mère II (combinaison de substances en traces)		20 fois	50	50
Solutions mères contenant les macronutriments (une substance par solution)				
$CaCl_2.2H_20$	293 800	1 000 fois	1,0	1,0
$MgSO_4.7H_2O$	246 600	2 000 fois	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 fois	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000 fois	1,0	1,0
$Na_2\ SiO_3.9H_2O$	50 000	5 000 fois	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000 fois	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000 fois	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000 fois	0,1	0,1

▼B

	Quantité ajoutée à l'eau (mg/l)	Concentration (par rapport au milieu M4)	Quantité de solution mère II ajoutée pour préparer le milieu (ml/l)	
			M4	M7
Solution mère de vitamines combinées	–	10 000 fois	0,1	0,1
La solution mère de vitamines combinées est préparée en additionnant 3 vitamines à 1 litre d'eau, comme indiqué ci-dessous:				
Chlorhydrate de thiamine	750	10 000 fois		
Cyanocobalamine (B12)	10	10 000 fois		
Biotine	7,5	10 000 fois		

La solution mère de vitamines combinées est congelée par petites parties aliquotes. Les vitamines sont ajoutées au milieu peu avant son utilisation.

NB:: Afin d'éviter que les sels ne se précipitent lorsqu'on prépare le milieu complet, il faut ajouter les parties aliquotes de solution mère à quelque 500 à 800 ml d'eau désionisée et amener le volume à 1 litre.

NB:: La première publication relative au milieu M4 se trouve dans Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, p. 25-33.

▼M6

C.3. ALGUES D'EAU DOUCE ET CYANOBACTÉRIES, ESSAI D'INHIBITION DE LA CROISSANCE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 201 (2006, annexe corrigée en 2011) de l'OCDE. Une révision de cette méthode d'essai s'est révélée nécessaire afin d'ajouter des espèces et d'actualiser la méthode pour tenir compte des exigences en matière d'évaluation des dangers et de classification des substances chimiques Cette révision s'est appuyée sur la somme des informations tirées, depuis son adoption, d'une solide expérience concrète, des avancées scientifiques dans le domaine des études de toxicité sur les algues et d'une longue pratique réglementaire.

2. Les définitions utilisées sont présentées à l'Appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

3. Cet essai vise à déterminer les effets d'une substance chimique sur la croissance d'algues microscopiques dulcicoles et/ou de cyanobactéries. Les organismes d'essai en phase de croissance exponentielle sont exposés à la substance chimique d'essai dans des cultures en lots sur une période durant normalement 72 heures. La relative brièveté de l'essai permet néanmoins d'évaluer les effets sur plusieurs générations.

4. L'effet observé est la réduction de la croissance dans une série de cultures d'algues (unités expérimentales) exposées à différentes concentrations de la substance chimique d'essai. L'effet est évalué en fonction de la concentration d'exposition, en comparaison avec la croissance moyenne d'une série de cultures témoins identiques et non traitées. Afin que les effets toxiques ne soient nullement restreints (sensibilité optimale des cultures), les cultures d'algues sont placées dans des conditions propres à une croissance exponentielle non limitée: éléments nutritifs en suffisance et lumière continue, et ce, sur une période assez longue pour que la réduction du taux de croissance spécifique puisse être mesurée.

5. La croissance et l'inhibition de la croissance sont quantifiées d'après des mesures de la biomasse des algues en fonction du temps. La biomasse des algues est définie en poids sec par volume, par exemple des milligrammes d'algues par litre de solution expérimentale. Le poids sec étant difficile à mesurer, on recourt à d'autres paramètres, tels que la numération cellulaire, qui est le plus souvent utilisé, ou le volume, la fluorescence et la densité optique cellulaires, etc. Le facteur de conversion du paramètre de substitution mesuré en biomasse doit être connu.

6. L'effet étudié est l'inhibition de la croissance, exprimée par l'accroissement logarithmique de la biomasse (taux de croissance spécifique moyen) durant la période d'exposition. La concentration entraînant un pourcentage donné d'inhibition du taux de croissance (par exemple 50 %) est déterminée en fonction des taux de croissance spécifiques moyens relevés dans une série de solutions expérimentales et exprimée sous la forme C_xE_t (par exemple $C_{50}E_t$).

7. Cette méthode d'essai comporte une variable étudiée supplémentaire, le rendement, requise par la réglementation de certains pays. Il est défini comme étant la différence entre la valeur de la biomasse à la fin de la période d'exposition et cette valeur au début de la période d'exposition. La concentration entraînant un pourcentage donné d'inhibition du rendement (par exemple 50 %) est calculée à partir du rendement enregistré dans une série de solutions expérimentales et exprimée en termes de C_xE_r (par exemple $C_{50}E_r$).

8. En outre, la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et la concentration sans effet observé (CSEO) peuvent être déterminées par un calcul statistique.

▼**M6**

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE CHIMIQUE D'ESSAI

9. Les informations sur la substance chimique d'essai pouvant être utiles à l'établissement des conditions expérimentales comprennent la formule structurale, la pureté, la stabilité à la lumière, la stabilité dans les conditions de l'essai, le pouvoir d'absorption lumineuse, le pK_a et les résultats d'études de transformation, notamment la biodégradabilité dans l'eau.

10. Il faut connaître l'hydrosolubilité, le coefficient de partage octanol-eau (P_{oe}) et la pression de vapeur de la substance chimique d'essai et disposer d'une méthode validée pour quantifier la substance dans les solutions expérimentales, méthode dont le rendement de récupération et le seuil de détection seront mentionnés dans le rapport.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

11. La validité de l'essai repose sur les critères de performance suivants:

— L'accroissement exponentiel de la biomasse des cultures témoins doit être d'un facteur au moins égal à 16 en l'espace de 72 heures (durée de l'essai). Ce qui correspond à un taux de croissance spécifique de 0,92/jour^{-1}. Le taux de croissance des espèces les plus fréquemment utilisées est généralement nettement supérieur (voir Appendice 2). Ce critère ne sera pas forcément rempli avec les espèces à croissance plus lente que celles énumérées à l'Appendice 2. Dans ce cas, il convient d'allonger la durée de l'essai, afin d'obtenir un facteur de multiplication de la croissance au moins égal à 16 dans les cultures témoins, la croissance devant être exponentielle tout au long de l'essai. La durée de l'essai peut être ramenée à au moins 48 heures pour maintenir une croissance exponentielle non limitée durant l'essai, pourvu que le facteur de multiplication minimal, à savoir 16, soit atteint.

— Le coefficient de variation moyen des taux de croissance spécifiques section par section (jours 0-1, 1-2 et 2-3, pour les essais de 72 heures) dans les cultures témoins (voir le «coefficient de variation» à l'Appendice 1) ne peut pas excéder 35 %. Le calcul du taux de croissance spécifique section par section est exposé au paragraphe 49. Ce critère s'applique à la valeur moyenne des coefficients de variation calculés pour les expériences identiques du groupe témoin.

— Le coefficient de variation des taux de croissance spécifiques moyens sur toute la durée de l'essai les cultures témoins identiques ne peut pas dépasser 7 % dans les essais menés sur Pseudokirchneriella subcapitata et Desmodesmus subspicatus. S'agissant des autres espèces moins souvent testées, cette valeur ne doit pas dépasser 10 %.

SUBSTANCE CHIMIQUE DE RÉFÉRENCE

12. Le procédé expérimental peut être vérifié au moyen de substance(s) chimiques de référence telle(s) que le 3,5-dichlorphénol, utilisé dans l'essai tournant international (1). Le dichromate de potassium peut également servir de substance de référence pour les algues vertes. Il est recommandé de mettre une substance de référence à l'essai au moins deux fois par an.

APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

13. La présente méthode d'essai se prête mieux aux substances hydrosolubles qui, dans les conditions de l'essai, sont susceptibles de rester dans l'eau. Les substances volatiles, s'adsorbant fortement, colorées, peu solubles dans l'eau

▼M6

ou les substances susceptibles d'affecter la disponibilité des nutriments ou des minéraux dans le milieu d'essai appellent éventuellement certaines modifications du procédé décrit (par exemple un système fermé, le conditionnement des récipients d'essai). Certaines modifications appropriées sont abordées dans les références (2)(3) et (4).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Appareillage

14. Les récipients expérimentaux et les autres appareils entrant en contact avec les solutions d'essai doivent être composés uniquement de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte. Il convient de les nettoyer à fond afin qu'aucun contaminant organique ou minéral n'interfère avec la croissance des algues ou la composition des solutions expérimentales.

15. Généralement en verre, les récipients d'essai possèdent des dimensions autorisant un volume de culture suffisant pour les mesures à effectuer durant l'essai et un transfert massique suffisant de CO_2 depuis l'atmosphère (voir paragraphe 30). Notons que le volume de liquide doit être assez grand pour les déterminations analytiques (voir paragraphe 37).

16. Une partie ou la totalité du matériel suivant peut également être nécessaire:

— Appareillage destiné aux cultures: il est recommandé d'utiliser une armoire ou une enceinte dans laquelle la température d'incubation choisie peut être maintenue à ± 2 °C près.

— Instruments de mesure de la lumière: il est important de savoir que la méthode de mesure de l'intensité lumineuse, et en particulier le type de capteur (collecteur), peut affecter la valeur mesurée. Il est préférable d'effectuer les mesures à l'aide d'un capteur sphérique 4π (sensible à la lumière directe et réfléchie provenant de tous les angles situés au-dessus et en dessous du plan de mesure) ou d'un capteur 2π (sensible à la lumière provenant de tous les angles situés au-dessus du plan de mesure).

— Dispositif permettant de déterminer la biomasse des algues: la numération cellulaire, qui est le paramètre de substitution le plus fréquemment utilisé pour déterminer la biomasse des algues, peut être effectuée avec un compteur électronique de particules, un microscope équipé d'une enceinte de comptage ou un cytomètre à flux. D'autres paramètres de substitution de la biomasse peuvent être mesurés au moyen d'un cytomètre à flux, d'un fluorimètre, d'un spectrophotomètre ou d'un colorimètre. Il est utile de calculer le facteur de conversion du nombre de cellules en poids sec de biomasse. Afin d'obtenir des mesures utiles pour les faibles concentrations de biomasse quand on utilise un spectrophotomètre, il peut s'avérer nécessaire d'employer des cuves avec une longueur d'au moins 4 cm.

Organismes d'essai

17. Plusieurs espèces d'algues microscopiques et de cyanobactéries ne formant pas d'agrégats peuvent être utilisées. Les souches énumérées à l'Appendice 2 se sont avérées convenir au protocole expérimental de la présente méthode d'essai.

18. Si l'on utilise d'autres espèces, il faut mentionner leur souche et/ou leur origine. Il y a lieu de confirmer que la croissance exponentielle des algues d'essai sélectionnées peut être maintenue tout au long de l'essai dans les conditions appliquées.

Milieu de croissance

19. Deux milieux de croissance possibles sont préconisés: celui de l'OCDE et le milieu AAP. Les compositions de ces milieux sont détaillées à l'Appendice 3. Il est à noter que la valeur initiale du pH et le pouvoir tampon (régulation de l'augmentation du pH) de ces deux milieux sont différents. En conséquence, les résultats des essais risquent d'être différents suivant le milieu employé, notamment avec des substances d'essai ionisantes.

▼M6

20. Il peut parfois s'avérer nécessaire de modifier le milieu de croissance, par exemple si la substance d'essai est un métal ou un agent chélatant ou si l'essai est mené à différents pH. L'utilisation d'un milieu modifié est décrite en détail et justifiée (3)(4).

Concentration initiale de la biomasse

21. La biomasse initiale doit être identique dans toutes les cultures de l'essai et suffisamment basse pour autoriser une croissance exponentielle tout au long de la période d'incubation sans risque d'épuisement des éléments nutritifs. La biomasse initiale ne dépassera pas 0,5 mg/l en poids sec. On recommande les concentrations cellulaires initiales suivantes:

Pseudokirchneriella subcapitata:	$5 \times 10^3 - 10^4$ cellules/ml
Desmodesmus subspicatus	$2\text{-}5 \times 10^3$ cellules/ml
Navicula pelliculosa	10^4 cellules/ml
Anabaena flos-aquae	10^4 cellules/ml
Synechococcus leopoliensis	$5 \times 10^4 - 10^5$ cellules/ml

Concentrations de la substance chimique d'essai

22. La gamme de concentrations dans laquelle des effets sont susceptibles de se produire peut être déterminée d'après les résultats d'essais de détermination de l'ordre de grandeur. L'essai proprement dit comprend au moins cinq concentrations formant une série géométrique et séparées par un facteur n'excédant pas 3,2. Un facteur supérieur peut se justifier pour les substances chimiques d'essai dont la courbe concentration-effet a une pente nulle. Il est préférable que la gamme de concentrations couvre des valeurs entraînant une inhibition de 5 à 75 % du taux de croissance des algues.

Expériences identiques et témoins

23. La conception de l'essai inclut trois expériences identiques à chaque concentration expérimentale. S'il n'est pas nécessaire de déterminer la CSEO, l'essai peut être modifié de manière à inclure un plus grand nombre de concentrations et un plus petit nombre d'expériences identiques par concentration. Le nombre d'expériences identiques pour le témoin est au moins trois et, idéalement, le double du nombre d'expériences identiques utilisées à chaque concentration expérimentale.

24. Un ensemble séparé de solutions d'essai peut être préparé pour les déterminations analytiques des concentrations de la substance chimique d'essai (voir paragraphes 36 et 38).

25. Si la substance chimique d'essai est solubilisée à l'aide d'un solvant, on inclut des témoins supplémentaires contenant le solvant à la même concentration que celle appliquée dans les cultures expérimentales.

Préparation de la culture de l'inoculum

26. Afin que les algues soumises à l'essai soient adaptées aux conditions expérimentales et soient bien en phase de croissance exponentielle lorsqu'on les utilise pour ensemencer les solutions d'essai, on prépare une culture d'inoculum dans le milieu expérimental 2 à 4 jours avant le début de l'essai. La biomasse des algues doit être ajustée afin que la culture de l'inoculum présente une croissance exponentielle jusqu'au moment où l'essai débute. La culture de l'inoculum est incubée dans les mêmes conditions que les cultures expérimentales. On mesure l'accroissement de la biomasse dans la

▼M6

culture de l'inoculum pour vérifier qu'elle présente une croissance normale pour la souche expérimentale en question dans les conditions de culture. Un exemple de méthode de culture des algues est décrit à l'Appendice 4. Pour éviter des divisions cellulaires synchrones durant l'essai, il est parfois nécessaire de lancer une seconde étape de propagation de la culture de l'inoculum.

Préparation des solutions expérimentales

27. Toutes les solutions expérimentales doivent contenir les mêmes concentrations de milieu de croissance et la même biomasse initiale d'algues d'essai. On prépare généralement les solutions expérimentales aux concentrations choisies en mélangeant une solution mère de la substance chimique d'essai avec le milieu de croissance et la culture de l'inoculum. Les solutions mères sont normalement préparées par dissolution de la substance dans le milieu d'essai.

28. Des solvants, par exemple de l'acétone, de l'alcool t-butylique et du diméthylformamide, peuvent être utilisés comme véhicules pour ajouter des substances peu solubles dans l'eau au milieu expérimental (2)(3). La concentration de solvant ne doit pas excéder 100 µl/l et doit être identique dans toutes les cultures (y compris les témoins) de l'essai.

Incubation

29. Les récipients expérimentaux sont munis de bouchons perméables à l'air. Les récipients sont agités et placés dans l'appareil destiné aux cultures. Durant l'essai, il est nécessaire de garder les algues en suspension et de faciliter le transfert de CO_2. À cette fin, les récipients sont agités, ou leur contenu est remué, en permanence. Les cultures doivent être maintenues à une température comprise entre 21 et 24 °C, maintenue à ± 2 °C près. Des températures plus élevées peuvent être appliquées pour des espèces autres que celles énumérées à l'Appendice 2, par exemple des espèces tropicales, à condition que les critères de validité soient respectés. Il est recommandé de disposer les récipients de façon aléatoire et de modifier quotidiennement leur emplacement dans l'incubateur.

30. Le pH du milieu des témoins ne doit pas s'accroître de plus de 1,5 unité durant l'essai. Dans le cas des métaux et des substances chimiques qui s'ionisent partiellement à un pH proche de celui de l'essai, il peut s'avérer nécessaire de limiter l'évolution du pH, afin d'obtenir des résultats reproductibles et bien définis. Il est techniquement possible de limiter l'évolution du pH à < 0,5 unité en induisant un taux adéquat de transfert massique de CO_2 de l'air environnant à la solution d'essai, par exemple en augmentant l'intensité de l'agitation. Une autre possibilité consiste à diminuer la demande en CO_2 en réduisant la biomasse initiale ou la durée de l'essai.

31. La surface sur laquelle les cultures sont incubées reçoit un éclairage continu, uniforme et fluorescent, par exemple «blanche froide» ou de type «lumière naturelle». Les besoins lumineux varient selon les souches d'algues et de cyanobactéries. L'intensité lumineuse est choisie en fonction de l'organisme d'essai utilisé. Pour les espèces d'algues vertes recommandées, l'intensité lumineuse au niveau des solutions d'essai doit être choisie dans l'intervalle 60-120 $\mu E\text{-}m^{-2} \cdot s^{-1}$ lorsqu'elle est mesurée dans le domaine de longueur d'onde autorisant la photosynthèse (400 à 700 nm) avec un capteur approprié. Certaines espèces, en particulier *Anabaena flos-aquae*, se développent bien sous des intensités lumineuses plus faibles et peuvent être endommagées par des intensités plus fortes. Pour ces espèces, il convient d'appliquer une intensité lumineuse moyenne comprise dans la gamme 40-60 $\mu E\text{-}m^{-2} \cdot s^{-1}$ (En ce qui concerne les instruments de mesure de la lumière étalonnés en lux, la gamme de 4 440-8 880 lux pour la lumière blanche froide correspond approximativement à l'intensité lumineuse recommandée de 60-120 $\mu E\text{-}m^{-2} \cdot s^{-1}$). L'intensité lumineuse ne s'écarte pas de plus de ± 15 % de l'intensité lumineuse moyenne dans la zone de l'incubation.

▼M6

Durée de l'essai

32. L'essai dure normalement 72 heures. Néanmoins des durées plus ou moins longues peuvent être appliquées, à condition que tous les critères de validité mentionnés au paragraphe 11 soient respectés.

Mesures et déterminations analytiques

33. La biomasse des algues contenue dans chaque flacon est déterminée au moins une fois par jour durant la période d'essai. Si les mesures sont effectuées sur de petits volumes extraits de la solution d'essai avec une pipette, ceux-ci ne doivent pas être réintroduits dans le récipient d'essai.

34. La biomasse est mesurée par comptage manuel des cellules au microscope ou au moyen d'un compteur électronique de particules (dénombrement des cellules et/ou biovolume). D'autres techniques, par exemple la cytométrie à flux, la fluorescence chlorophyllienne *in vitro* ou *in vivo* (5)(6) ou la densité optique, peuvent être utilisées, à condition de pouvoir démontrer qu'il existe une corrélation satisfaisante avec la biomasse dans la gamme de valeurs de la biomasse de l'essai.

35. Le pH des solutions est mesuré au début et à la fin de l'essai.

36. Si l'on dispose d'une méthode permettant d'analyser la substance chimique d'essai dans la gamme de concentrations appliquées, il faut analyser les solutions expérimentales afin de vérifier les concentrations initiales et le maintien des concentrations d'exposition durant l'essai.

37. L'analyse de la concentration de la substance chimique d'essai, au début et à la fin de l'essai, dans des récipients renfermant une concentration élevée, une concentration faible et une concentration proche de la CE_{50} escomptée peut suffire, si les concentrations d'exposition ne sont pas censées s'écarter de plus de 20 % des valeurs nominales durant l'essai. Il est préconisé d'analyser toutes les concentrations d'essai au début et à la fin de l'essai, si les concentrations ne sont pas supposées demeurer dans l'intervalle de 80-120 % de la concentration nominale. S'agissant des substances chimiques d'essai volatiles, instables ou s'adsorbant fortement, on recommande de prélever des échantillons à analyser toutes les 24 heures durant la période d'exposition, afin de préciser la perte de substance d'essai. Pour ces substances chimiques, il pourrait être nécessaire d'augmenter le nombre d'expériences identiques. Dans tous les cas, il suffira de déterminer la concentration de la substance d'essai dans un seul récipient traité de manière identique pour chaque concentration expérimentale (ou dans le mélange du contenu de tous les récipients traités de manière identique).

38. Les milieux d'essai destinés spécialement à l'analyse des concentrations d'exposition durant l'essai doivent être traités de la même manière que les milieux utilisés pour l'essai: ils doivent être ensemencés avec les algues et incubés dans des conditions identiques. Si l'on doit analyser la concentration de la substance chimique d'essai dissoute, les algues devront peut-être être séparées du milieu. À cette fin, il est préférable de procéder par centrifugation à une faible force d'accélération, suffisante pour sédimenter les algues.

39. S'il s'avère que la concentration de la substance d'essai a pu se maintenir tout au long de l'essai dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale ou mesurée initialement, l'analyse des résultats peut s'appuyer sur les valeurs nominales ou mesurées initialement. Si l'écart à la concentration nominale ou mesurée initialement est supérieur à ± 20 %, l'analyse des résultats devra reposer sur la moyenne géométrique de la concentration relevée durant l'exposition ou sur des modèles décrivant la baisse de la concentration de la substance chimique d'essai (3)(7).

▼M6

40. L'essai d'inhibition de la croissance des algues est un système expérimental plus dynamique que la plupart des autres essais de toxicité à court terme sur des organismes aquatiques. Aussi, les concentrations d'exposition réelles risquent d'être difficiles à définir, en particulier pour les substances s'adsorbant testées à faibles concentrations. Dans ces circonstances, la disparition de la substance de la solution par adsorption sur la biomasse croissante des algues ne signifie pas que la substance d'essai soit absente du système d'essai. En analysant le résultat de l'essai, il y a lieu de vérifier si la diminution de la concentration de la substance chimique d'essai au cours de l'essai s'est accompagnée d'une baisse de l'inhibition de la croissance. Si tel est le cas, on peut envisager d'appliquer un modèle décrivant convenablement la baisse de la concentration de la substance chimique d'essai (7). Dans le cas contraire, il sera peut-être pertinent de fonder l'analyse des résultats sur les concentrations initiales (nominales ou mesurées).

Autres observations

41. On observe au microscope la culture de l'inoculum pour vérifier si elle présente un aspect normal et sain ainsi que l'aspect des algues pour détecter la présence éventuelle d'anomalies (susceptibles de résulter de l'exposition à la substance chimique d'essai) à la fin de l'essai.

Essai limite

42. Dans certaines circonstances, par exemple lorsqu'un essai préliminaire indique que la substance chimique d'essai n'exerce aucun effet toxique à des concentrations allant jusqu'à 100 mg/l ou à sa limite de solubilité dans le milieu d'essai (suivant celle qui est la plus basse), on peut conduire un essai limite afin de comparer les réactions d'un groupe témoin avec celles d'un groupe traité (à 100 mg/l ou à une concentration égale à la limite de solubilité). Il est fortement recommandé d'étayer cet essai par une analyse de la concentration d'exposition. Tous les critères de validité et conditions expérimentales décrits précédemment s'appliquent à l'essai limite, si ce n'est que le nombre de récipients traités de manière identique doit être au moins égal à six. Les variables étudiées dans le groupe témoin et le groupe traité peuvent être analysées au moyen d'un test statistique permettant de comparer les moyennes, par exemple un test t de Student. Si les variances des deux groupes sont inégales, on effectue un test t ajusté en fonction des variances inégales.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Courbes de croissance

43. La biomasse des récipients d'essai peut être exprimée en unités du paramètre de substitution utilisé pour la mesurer (nombre de cellules, fluorescence, par exemple)

44. Porter dans un tableau la concentration estimée de la biomasse dans les cultures expérimentales et les cultures témoins, les concentrations de la substance d'essai et les moments des mesures, enregistrés avec une précision minimale de l'ordre de l'heure, afin d'obtenir les points des courbes de croissance. Les échelles tant logarithmiques que linéaires peuvent être utiles à ce premier stade, mais les échelles logarithmiques sont indispensables et représentent généralement mieux les variations du rythme de la croissance durant l'essai. Notons que la croissance exponentielle produit une droite lorsqu'elle est portée sur une échelle logarithmique et que la pente de cette droite indique le taux de croissance spécifique.

45. À l'aide des points portés sur le graphique, examiner si les cultures témoins se développent au rythme exponentiel prévu tout au long de l'essai. Étudier attentivement tous les points et l'allure des graphiques et vérifier si les données brutes et les méthodes employées ne sont entachées d'aucune erreur. Vérifier en particulier tous les points qui semblent s'écarter du tracé suivant une erreur systématique. Si, à l'évidence, la manière dont on a procédé comporte des erreurs identifiables ou très probables, le point concerné est à signaler comme une valeur nettement divergente et ne doit

▼M6

pas être pris en compte dans l'analyse statistique ultérieure (une concentration nulle d'algues dans un sur deux ou trois récipients traités de manière identique peut révéler que le récipient n'a pas été ensemencé correctement ou qu'il n'a pas été suffisamment bien nettoyé.) Les raisons pour lesquelles on a décidé d'exclure un point parce qu'on le considère comme une valeur nettement divergente sont exposées clairement dans le rapport d'essai. Les raisons acceptées ne représentent que des erreurs méthodologiques (rares) et non un manque de précision. Les méthodes statistiques d'identification des valeurs nettement divergentes sont d'un usage limité pour ce type de problème et ne peuvent remplacer le jugement d'un expert. Il est préférable de conserver les valeurs nettement divergentes (signalées comme telles) parmi les données présentées ultérieurement sur un graphique ou un tableau.

Variables étudiées

46. Cet essai est destiné à déterminer les effets de la substance chimique d'essai sur la croissance des algues. La présente méthode d'essai décrit deux variables étudiées, de manière à répondre aux différentes préférences et exigences réglementaires de juridictions distinctes. Pour que les résultats de l'essai soient acceptables par toutes les juridictions, les effets doivent être évalués en fonction des deux variables étudiées (a) et (b) définies ci-dessous.

a) taux de croissance spécifique moyen: cette variable étudiée est calculée d'après l'accroissement logarithmique de la biomasse pendant la durée de l'essai, exprimé par jour.

b) rendement: cette variable étudiée correspond à la valeur de la biomasse à la fin de l'essai diminuée de la valeur de la biomasse au début de l'essai.

47. Notons que les valeurs de toxicité calculées avec ces deux variables étudiées ne sont pas comparables et qu'il faut tenir compte de cette différence lorsqu'on utilise les résultats de l'essai. Les valeurs de la CE_x basées sur le taux de croissance spécifique moyen (C_xE_t) seront généralement supérieures à celles basées sur le rendement (C_xE_r), si les conditions expérimentales de la présente méthode d'essai sont appliquées, en raison de la base mathématique de chacune de ces approches. Cette différence n'est due qu'au calcul mathématique, il ne s'agit pas d'une différence de sensibilité entre les deux variables étudiées. Le concept du taux de croissance spécifique moyen repose sur l'allure générale de la croissance exponentielle des algues dans des cultures non limitées, où la toxicité est estimée d'après les effets sur le taux de croissance, sans tenir compte du niveau absolu du taux de croissance spécifique du témoin, de la pente de la courbe concentration-effet, ni de la durée de l'essai. En revanche, les résultats basés sur la variable de rendement dépendent de toutes ces autres variables. La C_xE_r dépend du taux de croissance spécifique de l'espèce d'algue utilisée dans chaque essai et du taux de croissance maximum spécifique susceptible de varier entre les espèces, voire entre différentes souches. Cette variable ne doit pas être utilisée pour comparer la sensibilité aux agents toxiques de différentes espèces d'algues, voire de différentes souches. S'il est préférable, du point de vue scientifique, d'estimer la toxicité d'après le taux de croissance spécifique moyen, la présente méthode d'essai inclut également l'estimation basée sur le rendement afin de satisfaire à la réglementation en vigueur dans certains pays.

Taux de croissance spécifique moyen

48. Le taux de croissance spécifique moyen durant une période donnée est calculé comme l'accroissement logarithmique de la biomasse, pour chaque expérience identique des groupes traités et témoins, au moyen de l'équation présentée ci-dessous (1):

▼M6

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{jour}^{-1}) \qquad [1].$$

où:

μ_{i-j} est le taux de croissance spécifique moyen du temps *i* au temps *j*;

X_i est la biomasse au temps *i*;

X_j est la biomasse au temps *j*.

Pour chaque groupe traité et témoin, calculer un taux de croissance moyen et les estimations de la variance.

49. Calculer le taux de croissance spécifique moyen sur l'ensemble de la durée de l'essai (normalement du jour 0 au jour 3), en prenant comme valeur de départ, la valeur nominale de la biomasse ensemencée plutôt que sa valeur mesurée, car cela permet généralement d'obtenir une plus grande précision. Si l'instrument utilisé pour mesurer la biomasse autorise des déterminations suffisamment précises d'une petite biomasse d'inoculum (par exemple un cytomètre à flux), la concentration initiale mesurée de la biomasse peut alors être utilisée. Évaluer également les taux de croissance section par section, en considérant, pour ce calcul, qu'ils équivalent aux taux de croissance spécifiques de chaque jour de l'essai (jours 0-1, 1-2 et 2-3) et vérifier si le taux de croissance des témoins reste constant (voir critères de validité, paragraphe 11). Le fait que le taux de croissance spécifique du premier jour soit sensiblement inférieur au taux de croissance spécifique moyen peut indiquer une phase de latence. S'il est possible de réduire presque à néant la phase de latence dans les cultures témoins par une propagation appropriée de la préculture, la présence d'une phase de latence dans les cultures exposées peut refléter un rétablissement après un choc toxique initial ou une exposition réduite due à une perte de substance chimique d'essai (notamment par sorption sur la biomasse des algues) après l'exposition initiale. Le taux de croissance section par section permet ainsi d'étudier les différents effets de la substance chimique d'essai durant la période d'exposition, d'où son intérêt. Des différences sensibles entre le taux de croissance section par section et le taux de croissance moyen traduisent un écart à la croissance exponentielle constante et appellent un examen attentif des courbes de croissance.

50. Calculer le pourcentage d'inhibition du taux de croissance pour chaque expérience identique de chaque groupe traité selon l'équation suivante:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100 \qquad [2],$$

où:

$\%\ I_r$ est le pourcentage d'inhibition du taux de croissance spécifique moyen;

μ_C est la valeur moyenne du taux de croissance spécifique moyen (μ) dans le groupe témoin;

μ_T est le taux de croissance spécifique moyen d'une des expériences identiques du groupe traité.

51. Si les solutions d'essai sont préparées à l'aide d'un solvant, c'est le témoin au solvant plutôt que le témoin sans solvant qui doit être utilisé pour calculer le pourcentage d'inhibition.

Rendement

52. Le rendement est calculé d'après la différence entre la valeur de la biomasse à la fin de l'essai et sa valeur au début de l'essai pour chaque expérience identique des groupes traités et témoins. Pour chaque concentration expérimentale et le témoin, calculer un rendement moyen ainsi que les estimations de la variance. Le pourcentage d'inhibition du rendement ($\%\ I_r$) peut être calculé pour chaque expérience identique de chaque groupe traité d'après la formule suivante:

▼M6

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \qquad [3]$$

où:

% I_y est le pourcentage d'inhibition du rendement

R_C est la valeur moyenne du rendement dans le groupe témoin

R_T est la valeur du rendement dans l'une des expériences identiques du groupe traité.

Courbes concentration-effet

53. Porter sur un graphique le pourcentage d'inhibition en fonction du logarithme de la concentration de la substance chimique d'essai et examiner les points attentivement, sans tenir compte des points ayant été éliminés parce que considérés comme des valeurs nettement divergentes au cours de la première phase. Faire passer une courbe régulière entre les points, à vue d'oeil ou par interpolation informatique, afin d'obtenir une première impression de la relation concentration-effet et poursuivre par une méthode plus détaillée, de préférence une méthode statistique informatisée. En fonction de l'usage auquel on destine les données, de la qualité (précision) et de la quantité des données ainsi que de la disponibilité des outils d'analyse des données, on pourra décider (et bien justifier certains cas) d'arrêter l'analyse des données à ce stade et de ne retenir que les chiffres clés, à savoir la CE_{50} et la CE_{10} (et/ou la CE_{20}), de la courbe ajustée à vue d'oeil (voir également la section ci-après sur les effets stimulants). Citons quelques raisons valables de ne pas recourir à une méthode statistique:

— traitées par des méthodes informatisées, les données ne livreront pas de résultats plus fiables que ceux obtenus par une analyse d'expert — dans ces circonstances, certains programmes informatiques risquent même d'être incapables de produire une solution fiable (les itérations peuvent ne pas converger, etc.)

— les effets stimulant la croissance ne peuvent être traités correctement par les programmes informatiques disponibles (voir plus bas).

Méthodes statistiques

54. L'objectif consiste à obtenir une relation quantitative concentration-effet par une analyse de la régression. Il est possible d'appliquer une régression linéaire pondérée après avoir effectué une transformation linéarisant les valeurs décrivant l'effet observé — par exemple en unités probit ou logit ou Weibull (8), mais il est préférable d'appliquer des méthodes de régression non linéaire, celles-ci traitant mieux les irrégularités inévitables des valeurs et les écarts par rapport aux distributions régulières. Proches de zéro ou de l'inhibition totale, ces irrégularités risquent d'être amplifiées par la transformation et d'interférer avec l'analyse (8). Notons que les méthodes d'analyse courantes faisant appel aux transformations probit, logit ou Weibull se prêtent aux effets par tout ou rien (mortalité ou survie, par exemple) et doivent être modifiées pour pouvoir être utilisées avec les valeurs de croissance ou de biomasse. Les références (9)(10) et (11) décrivent des procédures permettant de déterminer les valeurs de la CE_x à partir de données continues. L'utilisation d'une analyse de la régression non linéaire est détaillée à l'Appendice 5.

55. Pour chaque variable étudiée à analyser, utiliser la relation concentration-effet pour calculer des estimations ponctuelles des valeurs de CE_x. Déterminer, si possible, les limites de confiance à 95 % pour chaque estimation. La validité de l'ajustement des données décrivant les effets au modèle de régression est à évaluer par un procédé statistique ou graphique. L'analyse de la régression doit s'appuyer sur les effets relevés dans chaque récipient traité de manière identique et non sur les moyennes des groupes traités. Si toutefois, l'ajustement d'une courbe non linéaire est difficile ou échoue parce

▼M6

que les données sont trop dispersées, une régression peut alors être effectuée sur les moyennes des groupes, ce qui permet de réduire l'influence des valeurs soupçonnées d'être nettement divergentes. Le recours à cette option doit être signalé dans le rapport d'essai en tant qu'écart à la procédure normale, écart dû au fait que l'ajustement de la courbe avec les valeurs individuelles des expériences identiques n'a pas livré un bon résultat.

56. Les estimations de la CE_{50} et les limites de confiance peuvent aussi être obtenues par interpolation linéaire avec bootstrap (rééchantillonnage) (13), si les modèles ou les méthodes de régression disponibles ne conviennent pas aux données.

57. Afin d'estimer la CMEO, et par conséquent la CSEO, pour les effets de la substance chimique d'essai sur le taux de croissance, il est nécessaire de comparer les moyennes des groupes traités par des techniques d'analyse de la variance (ANOVA). La moyenne de chaque concentration doit ensuite être comparée avec la moyenne du témoin à l'aide d'un test approprié à comparaisons multiples ou de tendance. Les tests de Dunnett ou de William peuvent être utiles (12)(14)(15)(16)(17). Il est nécessaire de vérifier si l'hypothèse de l'ANOVA de l'homogénéité de la variance tient. Cette vérification peut être pratiquée par un procédé graphique ou par un test formel (17), notamment les tests de Levene ou de Bartlett. L'infirmation de l'hypothèse de l'homogénéité de la variance peut quelquefois être corrigée par une transformation logarithmique des données. Si l'hétérogénéité de la variance est extrême et ne peut être rectifiée par une transformation, on envisagera des méthodes d'analyse telles que les tests de tendance régressifs de Jonkheere. La référence (11) livre des renseignements supplémentaires sur la détermination de la CSEO.

58. Des découvertes récentes ont conduit les scientifiques à préconiser d'abandonner la notion de CSEO et de la remplacer par des estimations ponctuelles de la CE_x fondées sur la régression. Aucune valeur de x appropriée n'a encore été établie pour cet essai sur les algues. Néanmoins, une gamme de 10 à 20 % semble convenir (suivant la variable étudiée sélectionnée) et il est préférable de mentionner à la fois la CE_{10} et la CE_{20} dans le rapport.

Stimulation de la croissance

59. On observe quelquefois une stimulation de la croissance (inhibition négative) aux faibles concentrations. Ce phénomène peut résulter d'une hormèse («stimulation toxique») ou de l'introduction de facteurs de stimulation de la croissance, véhiculés par la substance d'essai, dans le milieu minimal utilisé. Notons que l'addition de nutriments minéraux ne devrait exercer aucun effet direct étant donné que le milieu d'essai doit contenir un excès de nutriments tout au long de l'essai. La stimulation à faible dose peut habituellement être ignorée dans les calculs de la CE_{50}, à moins qu'elle ne soit très prononcée. Néanmoins, si cette stimulation est extrême ou s'il faut calculer une valeur de CE_x pour une faible valeur de x, des procédures particulières pourraient être requises. On évitera, dans la mesure du possible, de soustraire les effets stimulants à l'analyse des données et, si le logiciel permettant d'ajuster la courbe ne peut pas accepter une stimulation mineure, une interpolation linéaire avec bootstrap peut être employée. Si la stimulation est extrême, l'utilisation d'un modèle d'hormèse est envisageable (18).

Inhibition non toxique de la croissance

60. Les substances d'essai absorbant la lumière peuvent abaisser le taux de croissance, car l'obscurcissement diminue la quantité de lumière disponible. Il y a lieu de séparer ces types d'effets physiques des effets toxiques en modifiant les conditions expérimentales et de rapporter les premiers séparément. Les références (2) et (3) donnent des indications à ce sujet.

RAPPORT D'ESSAI

61. Le rapport d'essai doit inclure les informations suivantes:

▼**M6**

Substance chimique d'essai:

— état physique et propriétés physico-chimiques pertinentes, y compris la limite de solubilité dans l'eau;

— données d'identification chimique (par exemple, numéro CAS), notamment la pureté (impuretés).

Espèce soumise à l'essai:

— souche, fournisseur ou source et conditions de culture utilisées.

Conditions expérimentales:

— date du début de l'essai et durée de l'essai;

— description de la conception de l'essai: récipients d'essai, volumes des cultures, densité de la biomasse au début de l'essai;

— composition du milieu;

— concentrations expérimentales et expériences identiques (par exemple nombre d'expériences identiques, nombre de concentrations expérimentales et progression géométrique appliquée);

— description de la préparation des solutions expérimentales, y compris l'utilisation de solvants, etc.

— appareillage destiné aux cultures:

— intensité et qualité lumineuses (source, homogénéité);

— température;

— concentrations mises à l'essai: concentrations d'essai nominales et tous les résultats d'analyses pour déterminer la concentration de la substance chimique d'essai dans les récipients expérimentaux. Le rendement de récupération de la méthode et le seuil de quantification dans la matrice expérimentale doivent être mentionnés;

— tous les écarts par rapport à la présente méthode d'essai;

— méthode de détermination de la biomasse et démonstration de la corrélation entre le paramètre mesuré et le poids sec.

Résultats:

— valeurs du pH au début et à la fin de l'essai dans tous les récipients traités;

— biomasse dans chaque récipient à chaque point de mesure et méthode de mesure de la biomasse;

— courbes de croissance (biomasse en fonction du temps);

— calcul des variables étudiées pour chaque expérience identique de chaque traitement ainsi que des moyennes et du coefficient de variation des expériences identiques;

— représentation graphique de la relation concentration-effet;

▼**M6**

— estimation de la toxicité pour les variables étudiées, par exemple la CE_{50}, la CE_{10} et la CE_{20} et intervalles de confiance associés. CMEO et CSEO, si elles ont été calculées, et méthodes statistiques appliquées à leur détermination;

— si une analyse de la variance (ANOVA) a été pratiquée, puissance de l'effet détectable (par exemple la différence la moins significative);

— stimulation de la croissance éventuellement observée dans un groupe traité;

— tout autre effet observé, par exemple changement morphologique des algues;

— analyse des résultats, y compris l'incidence sur les résultats de l'essai d'éventuels écarts par rapport à la présente méthode d'essai.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Organisation internationale de normalisation (1993) ISO 8692 Qualité de l'eau — Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires.

(2) Organisation internationale de normalisation (1998) ISO/DIS 14442 Qualité de l'eau — Lignes directrices pour essais d'inhibition de la croissance algale avec des matières peu solubles, des composés volatils, des métaux et des eaux résiduaires.

(3) OCDE 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Publications Hygiène et sécurité de l'environnement. Série sur les essais et l'évaluation n° 23. Organisation pour la coopération et le développement économiques, Paris.

(4) Organisation internationale de normalisation (1998) ISO 5667-16 Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 16: Lignes directrices pour les essais biologiques des échantillons.

(5) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525-2531.

(6) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22: 919-925

(7) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2073-2079.

(8) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19: 713-718.

(9) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 157-167.

(10) Bruce, R.D.,and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 1485-1494.

(11) OCDE (2006): Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation pour la Cooperation et le Development Economiques, Paris.

▼**M6**

(12) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.* 50: 1096-1121

(13) Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(14) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

(15) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(16) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 519-531.

(17) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

(18) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96. États-Unis.

▼M6

Appendice 1

Définitions

Les définitions et abréviations suivantes sont utilisées aux fins de la présente méthode d'essai:

Biomasse: poids sec de la matière vivante présente dans une population, exprimé en fonction d'un volume donné, par exemple en mg d'algues/litre de solution d'essai. D'habitude la biomasse est définie comme une masse, mais, dans cet essai, le terme «biomasse» se réfère à une masse par unité de volume. Remarquons également que, dans cet essai, la biomasse est en général mesurée indirectement, par la numération des cellules, la fluorescence, etc., si bien que le terme «biomasse» recouvre également ces mesures de substitution.

Substance chimique: une substance ou un mélange

Coefficient de variation: mesure sans dimension de la variabilité d'un paramètre, définie par le rapport de l'écart-type à la moyenne. Il s'exprime également en pourcentage. Le coefficient moyen de variation du taux de croissance spécifique moyen des expériences identiques du groupe témoin se calcule comme suit:

1. Calculer le coefficient de variation (en %) du taux de croissance spécifique moyen en fonction des taux de croissance quotidiens (section par section) pour chaque expérience identique.

2. Calculer la valeur moyenne de toutes les valeurs calculées au point 1, afin d'obtenir le coefficient moyen de variation du taux de croissance spécifique quotidien (section par section) des cultures témoins identiques.

CE_x: concentration de la substance chimique d'essai dissoute dans le milieu d'essai entraînant une réduction de x % (par exemple 50 %) de la croissance des organismes d'essai durant une période d'exposition définie (à mentionner explicitement si elle s'écarte de la durée normale ou totale de l'essai). Afin de distinguer les valeurs de la CE mesurées en fonction du taux de croissance de celles mesurées en fonction du rendement, on utilise les abréviations CE_t, s'agissant du taux de croissance, et CE_r, s'agissant du rendement.

Milieu de croissance: milieu de culture synthétique complet dans lequel les algues se développent lorsqu'elles sont exposées à la substance chimique d'essai, celle-ci étant généralement dissoute dans le milieu d'essai.

Taux de croissance (taux de croissance spécifique moyen): accroissement logarithmique de la biomasse durant la période d'exposition.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): concentration d'essai la plus faible à laquelle on observe que la substance chimique exerce un effet statistiquement significatif de réduction de la croissance (à $p < 0,05$) par comparaison avec le témoin, durant une période d'exposition donnée. Néanmoins, toutes les concentrations supérieures à la CMEO doivent avoir un effet néfaste supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Lorsque ces deux conditions ne peuvent pas être remplies, il faut expliquer en détail la façon dont la CMEO (et donc la CSEO) a été choisie.

Concentration sans effet observé (CSEO): concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO.

Variable étudiée: variable permettant d'estimer la toxicité à partir de n'importe quelle variable mesurée décrivant la biomasse, selon différentes méthodes de calcul. Dans la présente méthode d'essai, les taux de croissance et le rendement représentent les variables étudiées déduites de la mesure directe de la biomasse ou de sa mesure indirecte d'après l'un des paramètres de substitution mentionnés précédemment.

▼**M6**

Taux de croissance spécifique: variable étudiée correspondant au quotient de la différence des logarithmes népériens d'un paramètre observé (la biomasse, dans la présente méthode d'essai) par la période de temps respective.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Rendement: différence entre la valeur d'une variable mesurée à la fin de la période d'exposition et la valeur de cette variable mesurée au début de la période d'exposition, utilisée pour exprimer l'accroissement de biomasse durant l'essai.

▼**M6**

Appendice 2

Souches convenant à l'essai

Algues vertes

Pseudokirchneriella subcapitata (dénommée précédemment *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG.

Desmodesmus subspicatus (dénommé précédemment *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG.

Diatomées

Navícula pelliculosa, UTEX 664

Cyanobactéries

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Sources de souches

Les souches recommandées sont disponibles sous la forme de cultures unialgales dans les collections suivantes (par ordre alphabétique):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
États-Unis

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria LA22 0LP
UK

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nikolausberger Weg 18
37073 Göttingen
ALLEMAGNE

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
The University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
États-Unis.

▼M6

Aspect et caractéristiques des espèces recommandées

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Aspect	Cellules solitaires, incurvées et torses	Cellules ovales et solitaires la plupart du temps	Bâtonnets	Chaînes de cellules ovales	Bâtonnets
Dimensions (L × l) µm	8-14 × 2-3	7-15 × 3-12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Volume cellulaire (μm^3/cellule)	40-60 (1)	60-80 (1)	40-50 (1)	30-40 (1)	2,5 (2)
Poids sec des cellules (mg/cellule)	$2\text{-}3 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$1\text{-}2 \times 10^{-8}$	$2\text{-}3 \times 10^{-9}$
Taux de croissance (3) ($jour^{-1}$)	1,5 - 1,7	1,2 - 1,5	1,4	1,1 - 1,4	2,0 - 2,4

(1) Mesuré avec un compteur électronique de particules
(2) Calculé d'après la taille
(3) Taux de croissance le plus souvent observé dans le milieu de l'OCDE sous une intensité lumineuse approximative de 70 $\mu E\text{-}m^{-2}\ s^{-1}$ et à 21 °C

Recommandations particulières pour la culture et la manipulation des espèces d'essai recommandées

Pseudokirchneriella subcapitata et Desmodesmus subspicatus

Ces algues vertes sont généralement faciles à cultiver dans différents milieux de culture. Les collections de cultures renseignent les utilisateurs sur les milieux appropriés. Ces cellules sont normalement solitaires et la densité cellulaire se mesure aisément à l'aide d'un compteur électronique de particules ou d'un microscope.

Anabaena flos-aquae

La culture mère se conserve dans divers milieux de croissance. Il importe particulièrement d'éviter que le lot de culture ait dépassé la phase exponentielle de croissance au moment du renouvellement, le rétablissement étant difficile à ce stade.

Anabaena flos-aquae forme des chaînes de cellules enroulées en pelotes (agrégats). La dimension de ces agrégats est susceptible de varier en fonction des conditions de culture. Il peut s'avérer nécessaire de dissocier ces agrégats pour compter les cellules au microscope ou avec un compteur électronique de particules, afin de déterminer la biomasse.

Les chaînes de sous-échantillons peuvent être rompues en différents points par sonication, afin de réduire la variabilité lors du comptage. Une sonication plus longue que celle requise pour couper les chaînes en petits segments risque de détruire les cellules. L'intensité et la durée de la sonication doivent être identiques pour chaque traitement.

On dénombrera suffisamment de champs sur l'hémocytomètre (au moins 400 cellules) afin de compenser la variabilité. Cela augmentera la fiabilité des déterminations de la densité au microscope.

Après le découpage des chaînes de cellules par une sonication menée délicatement, le volume cellulaire total d Anabaena peut être déterminé avec un compteur électronique de particules. Il convient de régler l'énergie de la sonication de façon à éviter de briser les cellules.

Utiliser un mélangeur à vortex ou un instrument analogue pour s'assurer que la suspension d'algues utilisée pour ensemencer les récipients d'essai est bien mélangée et homogène.

▼**M6**

Les récipients d'essai doivent être placés sur une table agitée et animée d'un mouvement orbital ou de va-et-vient à environ 150 tours par minute. Les Anabaena peuvent également être agitées par intermittences de façon à former moins d'agrégats. Si elles s'agrègent, on veillera soigneusement à prélever des échantillons représentatifs pour les mesures de biomasse. Une agitation vigoureuse avant le prélèvement peut être nécessaire pour désagréger les agrégats d'algues.

Synechococcus leopoliensis

La culture mère se conserve dans divers milieux de croissance. Les collections de cultures renseignent les utilisateurs sur les milieux appropriés.

Synechococcus leopoliensis croît en formant des bâtonnets solitaires. La très petite dimension des cellules rend difficile le comptage au microscope pour les mesures de biomasse. Dans ce cas, il est utile de disposer d'un compteur électronique capable de dénombrer des particules mesurant jusqu'à 1 μm. Une mesure par fluorométrie in vitro convient également.

Navicula pelliculosa

La culture mère se conserve dans divers milieux de croissance. Les collections de cultures renseignent les utilisateurs sur les milieux appropriés. Ici, le milieu doit être additionné de silicate.

Navicula pelliculosa peut former des agrégats dans certaines conditions de culture. À cause de leur production lipidique, les cellules algales tendent parfois à s'accumuler dans le film qui se forme à la surface. Si tel est le cas, des mesures spéciales accompagneront le prélèvement de sous-échantillons en vue de la détermination de la biomasse, afin d'assurer la représentativité des échantillons. Une agitation vigoureuse, par exemple au moyen d'un mélangeur à vortex, peut être nécessaire.

▼**M6**

Appendice 3

Milieux de croissance

L'un des deux milieux de croissance suivants peut être utilisé:

— Milieu de l'OCDE: milieu de la première version de la ligne directrice 201 de l'OCDE, conforme à la norme ISO 8692

— Milieu AAP de l'Agence pour la protection de l'environnement des États-Unis (US EPA), conforme à l'ASTM.

Ces milieux doivent être préparés avec des produits de qualité «réactif» ou «pour analyse» et de l'eau désionisée.

Composition du milieu AAP (US EPA) et du milieu de la ligne directrice 201 de l'OCDE

Ingrédient	AAP		OCDE	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2$ 6(H_2O)	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2$· 2(H_2O)	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4$ · 7(H_2O)	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3$ · 6(H_2O)	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
Na_2EDTA · 2(H_2O)	0,300	0,000806	0,100	0,000269*
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2$ · 4(H_2O)	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2$ · 6(H_2O)	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
Na_2MoO_4·2(H_2O)	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2$ 2(H_2O)	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

Le rapport molaire de l'EDTA sur le fer est légèrement supérieur à l'unité. Cela empêche le fer de précipiter et réduit en même temps au minimum la chélation des ions de métaux lourds.

Dans l'essai mené sur la diatomée *Navicula pelliculosa*, les deux milieux doivent être additionnés de Na_2SiO_3 · $9H_2O$, afin d'atteindre une concentration de 1,4 mg de Si/l.

▼**M6**

Le pH du milieu est obtenu à l'équilibre entre le système carbonate du milieu et la pression partielle de CO_2 dans l'air atmosphérique. Le pH à 25 °C et la concentration molaire de bicarbonate sont liés approximativement par l'équation suivante:

$pH_{équ} = 11{,}30 + \log[HCO_3]$

Avec 15 mg/l de $NaHCO_3$, le $pH_{équ}$ = 7,5 (milieu de l'US EPA) et avec 50 mg/l de $NaHCO_3$, le $pH_{équ}$ = 8,1 (milieu de l'OCDE)

Composition élémentaire du milieu d'essai

Élément	AAP	OCDE
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Préparation du milieu de l'OCDE

Élément nutritif	Concentration dans la solution mère
Solution mère 1: macroéléments	
NH_4Cl	1,5 g/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Solution mère 2: fer	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l
Solution mère 3: oligoéléments	
H_3BO_3	185 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l

▼**M6**

Élément nutritif	Concentration dans la solution mère
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l
Solution mère 4: bicarbonate	
$NaHCO_3$	50 g/l
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Stériliser les solutions mères par filtration sur membrane (diamètre moyen des pores: 0,2 μm) ou à l'autoclave (15 minutes à 120 °C). Stocker les solutions à l'obscurité et à 4 °C.

Ne pas autoclaver les solutions mères 2 et 4 mais les stériliser par filtration sur membrane.

Préparer le milieu de croissance en ajoutant un volume approprié des solutions mères 1 à 4 à de l'eau:

Ajouter à 500 ml d'eau stérilisée:

10 ml de solution mère 1

1 ml de solution mère 2

1 ml de solution mère 3

1 ml de solution mère 4

Porter à 1 000 mL avec de l'eau stérilisée.

Attendre que le milieu atteigne l'équilibre avec le CO2 atmosphérique, si nécessaire, en y faisant barboter de l'air stérile et filtré durant quelques heures.

Préparation du milieu de l'US EPA

1. Ajouter 1 ml de chaque solution mère *2.1-2.7* à environ 900 ml d'eau désionisée ou distillée, et porter le volume à 1 litre.

2. Préparer les solutions mères de macroéléments en dissolvant les composés suivants dans 500 ml d'eau désionisée ou distillée. Les réactifs *2.1, 2.2, 2.3* et *2.4* peuvent être combinés dans une seule solution mère.

2.1	$NaNO_3$	12,750 g.
2.2	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	6,082 g.
2.3	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2,205 g.
2.4	Solution mère d'oligoéléments (voir 3)	
2.5	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,350 g.
2.6	K_2HPO_4	0,522 g.
2.7	$NaHCO_3$	7,500 g.
2.8	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	Voir Note 1.

▼**M6**

Note 1: À n'utiliser que pour les diatomées. Peut être ajouté directement (202,4 mg) ou véhiculé dans une solution mère pour donner une concentration finale de Si de 20 mg/l dans le milieu.

3. Préparer la solution mère d'oligoéléments en dissolvant les composés suivants dans 500 ml d'eau désionisée ou distillée:

3.1	H_3BO_3	92,760	mg.	
3.2	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	207,690	mg.	
3,3	$ZnCl_2$	1,635	mg.	
3,4	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	79,880	mg.	
3,5	CoCl2·6H2O	0,714	mg.	
3.6	Na2$MoO_4 \cdot 2H_2O$	3,630	mg.	
3.7	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,006	mg.	
3.8	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	150 000	mg	[Ethylènedinitrilotétraacétate de sodium].
3.9	$Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$	0,005	mg	Voir Note 2.

Note 2: À n'utiliser que dans le milieu pour les substances mères des diatomées.

4. Ajuster le pH à 7,5 ± 0,1 avec du NaOH ou de l'HCl 0,1 *N* ou 1,0 *N*.

5. Filtrer le milieu dans un récipient stérile sur un filtre à membrane à pores de 0,22 µm, si l'on utilise un compteur de particules, ou sur un filtre à pores de 0,45 µm, si l'on n'utilise pas de compteur de particules.

6. Garder le milieu à l'obscurité, à environ 4 °C jusqu'à son utilisation.

▼M6

Appendice 4

Exemple de méthode de culture des algues

Observations générales

La méthode suivante s'applique à la culture des algues destinées aux essais de toxicité.

Il convient d'utiliser des méthodes préservant les cultures d'algues de toute contamination bactérienne. Il peut être souhaitable d'établir des cultures axéniques, mais il faut employer des cultures unialgales.

Toutes les opérations doivent être conduites dans des conditions stériles, afin d'éviter toute contamination par des bactéries ou d'autres algues.

Matériel

Voir la rubrique Méthode d'essai: Appareillage

Procédé d'obtention de cultures d'algues

Préparation de solutions nutritives (milieu):

Tous les sels minéraux du milieu sont préparés sous la forme de solutions mères concentrées et entreposées au frais et à l'abri de la lumière. Ces solutions sont stérilisées par filtration ou à l'autoclave.

On prépare le milieu en ajoutant une quantité correcte de solution mère à de l'eau distillée stérile, en prenant bien soin d'éviter tout risque d'infection. Pour les milieux solides, on ajoute 0,8 % d'agar.

Culture mère:

Les cultures mères qui servent de matériau d'essai initial sont de petites cultures d'algues régulièrement transférées dans un milieu frais. Si les cultures ne sont pas utilisées régulièrement, il convient de les étaler en stries dans des tubes inclinés remplis d'agar. Ces cultures sont transférées dans un milieu frais au moins une fois tous les deux mois.

Les cultures mères sont cultivées dans des erlenmeyers contenant le milieu approprié (volume de quelque 100 ml). Lorsque les algues sont incubées à 20 °C sous un éclairage permanent, un transfert hebdomadaire s'impose.

Lors du transfert, on transvase avec des pipettes stériles une quantité telle de «vieille» culture, dans un flacon de milieu frais, que, pour les espèces à croissance rapide, la concentration initiale est environ 100 fois inférieure à ce qu'elle était dans la vieille culture.

Le taux de croissance d'une espèce peut être déterminé à partir de la courbe de croissance. S'il est connu, il est possible d'estimer la densité à laquelle la culture doit être introduite dans le nouveau milieu. Il convient de le faire avant que la culture atteigne la phase de mort.

Préculture:

La préculture sert à fournir une quantité d'algues suffisante pour l'ensemencement des cultures d'essai. La préculture est incubée dans les conditions de l'essai et utilisée lorsqu'elle est encore en croissance exponentielle, normalement après une période d'incubation de 2 à 4 jours. Si les cultures d'algues renferment des cellules déformées ou anormales, il faut éliminer ces cultures.

▼M6

Appendice 5

Analyse des données par une régression non linéaire

Considérations générales

L'effet observé dans les essais sur les algues et autres essais sur la croissance de micro-organismes (augmentation de la biomasse) est, par nature, exprimé par une variable continue ou métrique — le rythme d'un processus si l'on utilise le taux de croissance et son intégrale en fonction du temps si on choisit la biomasse. Ces deux variables sont comparées à l'effet moyen correspondant observé sur des témoins non exposés (représentés en plusieurs exemplaires identiques) manifestant un effet maximal dans les conditions imposées, la lumière et la température étant les principaux facteurs déterminants dans l'essai sur les algues. Le système est distribué ou homogène et la biomasse peut être considérée comme un continuum où il est fait abstraction des cellules individuelles. La distribution de la variance du type d'effet d'un tel système ne dépend que des facteurs expérimentaux (décrits généralement par les distributions log-normales ou normales de l'erreur). Et ce, contrairement aux bioessais classiques où les effets sont exprimés par des réponses par tout ou rien pour lesquelles la tolérance (affichant généralement une distribution binomiale) des organismes individuels est souvent supposée être la composante dominante de la variance. Dans ce cas, l'effet relevé chez les témoins est nul ou assimilé à un niveau de fond.

Dans la situation simple, l'effet normalisé ou relatif, r, diminue de façon monotonique de 1 (inhibition nulle) à 0 (inhibition à 100 %). Notons que tous les effets ont une erreur associée et qu'il est possible de calculer les inhibitions négatives apparentes en considérant qu'elles résultent uniquement de l'erreur aléatoire.

Analyse de la régression

Modèles

Une analyse de la régression a pour objet de décrire quantitativement la courbe concentration-effet sous la forme d'une fonction mathématique de régression $Y = f(C)$ ou, plus souvent, $F(Z)$ où $Z = \log C$. La fonction inverse, $C = f^{-1}(Y)$ permet de calculer des valeurs de la CE_x, notamment les CE_{50}, CE_{10} et CE_{20}, et leurs limites de confiance à 95 %. Plusieurs fonctions mathématiques simples se sont avérées décrire correctement la relation concentration-effet obtenue dans les essais d'inhibition de la croissance des algues. Parmi ces fonctions, citons l'équation logistique, l'équation asymétrique de Weibul et la distribution log-normale, qui sont toutes des courbes sigmoïdes se rapprochant asymptotiquement de zéro pour $C \rightarrow 0$ et de un pour $C \rightarrow$ infini.

L'utilisation de modèles de fonctions de seuil continues (par exemple le modèle de Kooijman pour «l'inhibition de la croissance de la population», Kooijman et al., 1996) constitue une solution récemment proposée, différente des modèles asymptotiques. Ce modèle suppose qu'il n'y a pas d'effet aux concentrations inférieures à un certain seuil, CE_0+, estimé par une extrapolation de la relation concentration-effet consistant à intercepter l'axe des concentrations à l'aide d'une fonction continue simple non différentiable au point de départ.

Notons que l'analyse peut être une simple minimisation des sommes des carrés résiduels (en supposant que la variance est constante) ou des carrés pondérés si l'hétérogénéité de la variance est compensée.

Marche à suivre

La procédure peut être résumée comme suit: Sélectionner une équation fonctionnelle appropriée, $Y = f(C)$, et l'ajuster aux données par une régression non linéaire. Utiliser de préférence les mesures relevées dans chaque flacon, plutôt que les moyennes des expériences identiques, afin de tirer un maximum d'informations des données. D'un autre côté, si la variance est élevée, l'expérience

▼M6

pratique nous porte à croire que les moyennes des expériences identiques peuvent fournir une estimation mathématique plus solide, moins influencée par les erreurs systématiques des données, que chaque donnée prise individuellement.

Porter sur un graphique les valeurs mesurées et la courbe ajustée et vérifier si l'ajustement est valable. L'analyse des valeurs résiduelles peut être particulièrement utile à ce propos. Si la fonction choisie pour ajuster la courbe concentration-effet ne décrit pas bien l'ensemble de la courbe ou une partie essentielle de celle-ci, telle que les effets aux faibles concentrations, choisir un autre modèle d'ajustement, par exemple une courbe asymétrique, telle que la fonction de Weibul, à la place d'une fonction symétrique. Les inhibitions négatives peuvent poser un problème, par exemple avec la fonction de distribution log-normale, qui nécessitera, de la même manière, la recherche d'une autre fonction de régression. Il est déconseillé d'assigner une valeur nulle ou une faible valeur positive à ces valeurs négatives parce que cela déforme la distribution des erreurs. Il peut être utile de procéder à des ajustements séparés sur des portions de la courbe telles que celle où l'inhibition est faible, afin d'estimer les valeurs de $CE_{x\ faibles}$. En partant de l'équation ajustée (par «estimation inverse», $C = f^{-1}(Y)$), calculer des estimations ponctuelles caractéristiques des CE_x et rapporter au moins la CE_{50} et une ou deux $CE_{x\ faibles}$. La pratique des essais a montré que la précision de l'essai sur les algues permet normalement d'effectuer une estimation raisonnablement précise au seuil de 10 % d'inhibition si les points dont on dispose sont en nombre suffisant — à moins qu'une stimulation ne survienne aux faibles concentrations, ce qui créerait une confusion. La précision de l'estimation de la CE_{20} est souvent bien meilleure que celle de la CE_{10}, parce que la CE_{20} se situe généralement sur la partie à peu près linéaire de la courbe concentration-effet centrale. Quelquefois, la CE_{10} peut être difficile à interpréter à cause de la stimulation de la croissance. De sorte que, même si la CE_{10} s'obtient généralement avec une précision suffisante, il est toujours recommandé de mentionner également la CE_{20}.

Facteurs de pondération

En général, la variance expérimentale n'est pas constante et inclut une composante proportionnelle, d'où l'intérêt de procéder d'office à une régression pondérée. Les facteurs de pondération s'appliquant à une telle analyse sont normalement supposés être inversement proportionnels à la variance:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

De nombreux programmes de régression permettent d'effectuer une analyse de la régression pondérée avec des facteurs de pondération repris dans un tableau. Pour se simplifier la tâche, il faudrait normaliser les facteurs de pondération en les multipliant par $n/\Sigma\ w_i$ (n étant le nombre de données) de telle sorte que leur somme soit égale à un.

Normalisation des valeurs prises par les effets

La normalisation par la valeur moyenne de l'effet sur les témoins donne lieu à certains problèmes de principe et à une structure de variance plutôt compliquée. En divisant les valeurs par la valeur moyenne des témoins en vue d'obtenir le pourcentage d'inhibition, on introduit une erreur supplémentaire due à l'erreur sur la moyenne des témoins. À moins que cette erreur soit négligeable, les facteurs de pondération appliqués à la régression et les limites de confiance doivent être corrigés en fonction de la covariance avec le témoin (Draper and Smith, 1981). Notons qu'il est important d'obtenir une précision élevée pour la moyenne estimée des valeurs affichées par les témoins, afin de minimiser la variance globale de l'effet relatif. Cette variance se calcule comme suit:

(l'indice i se réfère au niveau de concentration i et l'indice 0 aux témoins):

$$Y_i = \text{effet relatif} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

▼**M6**

avec une variance $Var(Y_i) = Var\ (r_i/r_0) \cong (\partial Y_i/\partial r_i)^2 \cdot Var(r_i) + ((\partial Y_i/\partial r_0)^2 \cdot Var(r_0)$

et comme $(\partial Y_i/\partial r_i) = 1/r_0$ and $(\partial Y_i/\partial r_0) = r_i/r_0^2$

avec des données à distribution normale et des expériences identiques m_i et m_0: $Var(r_i) = \sigma 2/m_i$

la variance totale de l'effet relatif Y_i devient donc

$$Var(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0$$

L'erreur sur la moyenne du témoin est inversement proportionnelle à la racine carrée du nombre d'expériences identiques du témoin prises en compte dans la moyenne, et il est quelquefois justifié d'inclure des données antérieures, ce qui réduit considérablement l'erreur. Il est également possible de ne pas normaliser les données ni d'ajuster les effets absolus, y compris l'effet affiché par le témoin, mais d'introduire la valeur de l'effet prise par le témoin en tant que paramètre supplémentaire à ajuster par une régression non linéaire. Avec une équation de régression ordinaire à deux paramètres, cette méthode requiert l'ajustement de trois paramètres et demande, par conséquent, plus de points qu'une régression non linéaire pratiquée sur des données normalisées à l'aide d'une valeur de l'effet prise par le témoin déterminée à l'avance.

Intervalles de confiance inverses

Le calcul des intervalles de confiance d'une régression non linéaire par une estimation inverse est assez complexe et ne figure généralement pas parmi les options livrées avec les programmes courants de calcul statistique. Des limites de confiance approximatives peuvent être obtenues avec des programmes classiques de régression non linéaire, à l'aide d'une reparamétrisation (Bruce et Versteeg, 1992), consistant à reformuler l'équation mathématique en prenant les estimations ponctuelles désirées, par exemple la CE_{10} et la CE_{50}, comme paramètres à estimer. Soit la fonction I = f (α, β, concentration), utilisons les relations de définition f (α, β, CE_{10}) = 0,1 et f (α, β, CE_{50}) = 0,5 pour remplacer f (α, β, concentration) par une fonction équivalente g (CE_{10}, CE_{50}, concentration).

Il existe un calcul plus direct (Andersen et al., 1998) effectué en conservant l'équation d'origine et en appliquant une expansion de Taylor autour des moyennes de r_i et r_0.

Les procédés par bootstrap, introduits récemment, sont appréciés. Ces procédés utilisent les données mesurées et un rééchantillonnage fréquent dirigé par un générateur de nombre aléatoire, pour estimer une distribution empirique de la variance. Références:

BIBLIOGRAPHIE

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625-1632.

Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

Bruce, R..D. and Versteeg,, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Chem. Chem.* 11, 1485-1494.

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998). Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405-420.

▼B

C.4. DÉTERMINATION DE LA BIODÉGRADABILITÉ «FACILE»

PARTIE I. GÉNÉRALITÉS

I.1. INTRODUCTION

Six méthodes d'essai permettant d'évaluer la biodégradabilité facile de produits chimiques en milieu aqueux en aérobiose sont décrites:

a) Disparition du carbone organique dissous (COD) (Méthode C.4-A)

b) Essai de screening modifié de l'OCDE — Disparition du COD — (Méthode C.4-B)

c) Dégagement de dioxyde de carbone (CO_2) (Essai Sturm modifié) (Méthode C.4-C)

d) Respirométrie manométrique (Méthode C.4-D)

e) Fiole fermée (Méthode C.4-E)

f) MITI (ministère de l'industrie et du commerce international — Japon) (Méthode C.4-F)

La partie I contient des considérations d'ordre général ainsi que des considérations communes aux six essais. Les particularités propres à chaque méthode sont décrites dans les parties II à VII. Les annexes contiennent définitions, formules et données de référence.

Un exercice comparatif interlaboratoires de l'OCDE, réalisé en 1988, a montré que ces méthodes donnent des résultats comparables. Toutefois, l'une ou l'autre de ces méthodes peut être préférable en fonction des caractéristiques physiques de la substance.

I.2. CHOIX DE LA MÉTHODE APPROPRIÉE

Il est essentiel, pour choisir la méthode la mieux appropriée, de disposer d'informations concernant la solubilité, la pression de vapeur et les caractéristiques d'adsorption de la substance à étudier. Pour calculer la valeur théorique et/ou vérifier les valeurs mesurées d'un paramètre tel que la DThO, le CO_2Th, le COD, le COT et la DCO (voir annexes I et II), il est nécessaire de connaître la structure chimique ou la formule brute du produit.

Toutes ces méthodes sont applicables aux substances d'essai qui peuvent être dissoutes dans l'eau à des concentrations de 100 mg/l au moins, pourvu qu'elles ne soient ni volatiles ni adsorbables. Dans le cas de produits peu hydrosolubles, volatiles ou adsorbables, les méthodes appropriées sont indiquées dans le tableau 1. La manière de procéder avec les produits faiblement hydrosolubles et les substances volatiles est décrite à l'annexe III. Les substances modérément volatiles peuvent être étudiées à l'aide de la méthode de disparition du COD pourvu que les récipients d'essai contiennent un volume gazeux suffisant et qu'ils soient fermés de manière appropriée. Dans ce cas, un contrôle abiotique doit toutefois être prévu afin de tenir compte de toute perte physique.

▼B

Tableau 1

Limites d'application des méthodes d'essai

Essai	Méthode analytique	Approprié pour les substances qui sont:		
		faiblement solubles	volatiles	adsorbables
Disparition du COD	Carbone organique dissous	—	—	+/-
Screening modifié de l'OCDE	Carbone organique dissous	—	—	+/-
Dégagement de CO_2	Respirométrie: dégagement de CO_2	+	—	+
Respirométrie manométrique	Respirométrie manométrique: consommation d'oxygène	+	+/-	+
Fiole fermée	Respirométrie: oxygène dissous	+/-	+	+
MITI	Respirométrie: consommation d'oxygène	+	+/-	+

L'interprétation des résultats obtenus nécessite des informations sur la pureté de la substance à étudier ou sur les proportions relatives de ses principaux composants, en particulier lorsque ces résultats sont faibles ou marginaux.

Il peut être extrêmement utile de disposer d'informations sur la toxicité du produit à étudier vis-à-vis des bactéries (annexe IV) pour choisir les concentrations d'essai appropriées et interpréter les résultats de biodégradation, notamment lorsque les valeurs sont peu élevées.

I.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

La procédure est contrôlée à l'aide de substances de référence répondant aux critères de biodégradabilité facile. Ces substances sont étudiées parallèlement aux substances d'essai en ajoutant une fiole appropriée à la série normale d'essais.

Les produits chimiques adéquats sont l'aniline (fraîchement distillée), l'acétate de sodium et le benzoate de sodium. Ces produits de référence sont tous dégradés dans les conditions de ces méthodes, même si aucun inoculum n'est délibérément ajouté.

Il avait été suggéré de retenir un produit de référence qui soit facilement biodégradable, mais qui nécessite l'addition d'un inoculum. L'hydrogéno-phtalate de potassium a été proposé mais le bien-fondé de son utilisation reste à démontrer, avant de l'accepter comme substance de référence.

Dans le cas des essais respirométriques, les composés azotés peuvent influencer la consommation d'oxygène du fait de la nitrification (voir les annexes II et V).

I.4. PRINCIPE DES MÉTHODES D'ESSAI

Une solution ou une suspension de la substance à étudier dans un milieu minéral est ensemencée et incubée en aérobiose, dans l'obscurité ou sous lumière diffuse. La quantité de COD due à l'inoculum présente dans la solution d'essai doit être aussi faible que possible par rapport à la quantité de COD provenant de la substance à étudier. L'activité endogène de l'inoculum est estimée en effectuant parallèlement des essais à blanc avec l'inoculum mais sans addition de substance à étudier, quoique l'activité endogène des cellules en présence de la substance ne correspond pas exactement à celle de ce contrôle endogène. Un essai avec une substance de référence est effectué en parallèle pour vérifier le fonctionnement de ces procédures.

▼B

La dégradation est en général suivie par la détermination de paramètres comme le COD, la production de CO_2 ou la consommation d'oxygène et les mesures sont effectuées avec une fréquence suffisante pour permettre l'identification du commencement et de la fin de la biodégradation. Les respiromètres automatiques permettent d'effectuer des mesures en continu. Le COD est parfois mesuré en plus d'un autre paramètre, mais cela n'est généralement le cas qu'au début et à la fin de l'essai. Une analyse chimique spécifique peut également servir à évaluer la dégradation primaire de la substance à étudier et à déterminer la concentration de toutes les substances intermédiaires formées (obligatoire dans l'essai MITI).

L'essai dure normalement 28 jours. Un essai peut cependant être interrompu avant, dès lors que la courbe de biodégradation atteint un plateau qui se prolonge au moins sur trois mesures. Un essai peut également être prolongé au-delà de 28 jours si la courbe montre que la biodégradation a manifestement commencé sans toutefois avoir atteint un palier le 28^{e} jour.

I.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

I.5.1. **Reproductibilité**

En raison de la nature de la biodégradation et de l'hétérogénéité des populations bactériennes utilisées comme inoculum, les mesures doivent être effectuées au moins en double.

On observe souvent que plus la concentration initiale des micro-organismes ajoutés au milieu d'essai est élevée, plus la variation entre les répétitions est faible. Des essais d'intercomparaison ont également montré que des variations importantes peuvent apparaître entre les résultats obtenus dans différents laboratoires, mais les résultats relatifs aux produits de référence facilement biodégradables sont généralement en bonne harmonie.

I.5.2. **Validité de l'essai**

Un essai est considéré comme valable si la différence entre les valeurs extrêmes en double de la mesure de la disparition du produit à étudier, au niveau du plateau, à la fin de l'essai ou à la fin de la fenêtre de 10 jours, est inférieure à 20 % et si le pourcentage de dégradation du produit de référence a atteint le niveau correspondant à une biodégradabilité facile en 14 jours. Si l'une de ces conditions n'est pas remplie, l'essai devra être recommencé. En raison du caractère rigoureux de ces méthodes, un résultat peu élevé ne signifie pas nécessairement que la substance soumise à l'essai n'est pas biodégradable dans les conditions de l'environnement; il indique seulement que d'autres études seront nécessaires pour en faire la preuve.

Si, lors d'un essai de toxicité effectué avec une solution contenant à la fois la substance à étudier et un produit de référence, la dégradation est inférieure à 35 % (établie d'après le COD) ou à 25 % (établie d'après la DThO ou le CO_2Th) au cours des 14 premiers jours, on peut estimer que le produit a un effet inhibiteur (voir également l'annexe IV). La série d'essais doit être recommencée, si possible en utilisant une concentration de substance à étudier plus faible et/ou une concentration d'inoculum plus élevée, sans toutefois dépasser 30 mg/l de matière en suspension.

I.6. PROCÉDURES ET PRÉPARATIONS GÉNÉRALES

Les conditions générales qui s'appliquent aux essais sont résumées dans le tableau 2. Les appareils et les conditions expérimentales spécifiques d'un essai particulier sont décrits ci-après dans les chapitres consacrés à chaque essai.

▼B

Tableau 2

conditions d'essai

Essai	Disparition du COD	Dégagement de CO_2	Respirométrie manométrique	Screening modifié de l'OECD	Fiolé fermée	MITI (1)
Concentration de la substance à étudier						
en: mg/l C			100		2-10	100
mg/l COD	10-40	10-20		10-40		
mg/l DThOD			50-100		5-10	
Concentration de l'inoculum (approximative, en cellules/l)	≤ le; 30 mg/l MES ou ≤ le; 100 ml/l d'effluent (10^7 — 10^8)			0,5 ml/l d'effluent secondaire (10^5)	jusqu'a 5 ml/l d'effluent (10^4 — 10^6)	30 mg/l MES (10^7 — 10^8)
Concentration d'éléments dans le milieu minéral (en mg/l):						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	112				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05 - 0,1				0,05 - 0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					de préférence 7,0
Température	22 ± °C					25 ± 1 °C

COD = Carbone Organique Dissout DThOD = Demande Théorique en Oxygène MES = Matières en Suspension

I.6.1. **Eau de dilution**

De l'eau désionisée ou distillée, exempte de substances toxiques à des concentrations inhibitrices (tels que des ions Cu^{++}), est utilisée. Elle ne contient pas plus de 10 % de la quantité de carbone organique introduite par la substance à étudier. L'eau d'essai doit être d'un haut degré de pureté afin d'éviter des valeurs élevées dans les essais à blanc. Des contaminations peuvent provenir non seulement des impuretés inhérentes, mais également des résines échangeuses d'ions et de matières provenant de la lyse des bactéries et des algues. Pour chaque série d'essais, n'utiliser qu'un même lot d'eau dont la teneur en COD doit être analysée au préalable. Une telle analyse n'est pas nécessaire pour l'essai en fiole fermée, mais la consommation en oxygène à partir de l'eau doit être faible.

▼B

I.6.2. **Solutions mères de sels minéraux**

Les solutions de sels minéraux utilisées pour l'essai sont préparées à partir de solutions mères de concentration appropriée. Les solutions mères décrites ci-après peuvent être utilisées (avec différents facteurs de dilution) dans les méthodes de disparition du COD, de screening modifié de l'OCDE, de dégagement de CO_2, de respirométrie manométrique et dans l'essai en fiole fermée.

Les facteurs de dilution et, pour l'essai MITI, la préparation spécifique du milieu minéral sont mentionnés dans les chapitres consacrés à chaque essai.

Solutions mères:

Les solutions mères suivantes sont préparées en utilisant des réactifs de qualité analytique:

a)	Dihydrogénophosphate de potassium KH_2PO_4	8,50 g
	Monohydrogénophosphate de potassium K_2HPO_4	21,75 g
	Monohydrogénophosphate de sodium dihydraté Na_2HPO_4 $2H_20$	33,40 g
	Chlorure d'ammonium NH_4Cl	0,50 g
	Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre. Le pH de la solution doit être égal à 7,4.	
b)	Chlorure de calcium, anhydre $CaCl_2$	27,50 g
	ou chlorure de calcium dihydraté $CaCl_2$, 2 H_2O	36,40 g
	Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre	
c)	Sulfate de magnésium heptahydraté, $MgSO_4$,7 H_2O	22,50 g
	Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre	
d)	Chlorure de fer (III) hexahydraté, $FeCl_3$, 6 H_2O	0,25 g
	Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre	

Note: Afin d'éviter d'avoir à préparer cette solution immédiatement avant usage, ajouter une goutte d'HCl concentré ou 0,4 g/1 de sel disodique d'acide éthylènediaminetétra-acétique (EDTA).

I.6.3. **Solutions mères de produits chimiques**

Dissoudre, si la solubilité excède 1 g/1, par exemple, entre 1 et 10 g, selon les cas, de substance à étudier ou de substance de référence dans de l'eau désionisée et compléter le volume à 1 litre. Dans le cas contraire, préparer des solutions mères dans du milieu minéral ou ajouter directement le produit au milieu minéral. Dans le cas de substances de plus faible solubilité, se référer à l'annexe III, mais noter que, dans l'essai MITI (Méthode C.4-F), aucun solvant ni émulsifiant ne doit être utilisé.

▼B

I.6.4. **Inoculums**

L'inoculum peut provenir de plusieurs sources: boues activées, effluents non chlorés, eaux de surface, sols, ou encore un mélange de ceux-ci. Pour les essais de disparition du COD, de dégagement de CO_2 et de respirométrie manométrique, si des boues activées sont utilisées, elles doivent provenir d'une station d'épuration ou d'une unité pilote traitant principalement des eaux ménagères. Il a été montré que les inoculums provenant d'autres sources donnent des résultats plus dispersés. Pour l'essai de screening modifié de l'OCDE et l'essai en fiole fermée, il convient d'utiliser un inoculum plus dilué ne contenant pas de flocs de boue et la source la plus appropriée consiste en un effluent secondaire d'une station d'épuration des eaux résiduaires urbaines ou d'une installation à l'échelle du laboratoire. Pour l'essai MITI, l'inoculum, qui provient d'un mélange de plusieurs origines, est décrit dans le chapitre consacré à cet essai.

I.6.4.1. *lnoculum provenant de boues activées*

Recueillir un échantillon de boue activée dans le compartiment d'aération d'une station d'épuration traitant des eaux résiduaires ou d'une installation à l'échelle du laboratoire traitant principalement les eaux ménagères. Éliminer, si nécessaire, les grosses particules par filtration à travers un tamis fin et conserver ensuite la boue en aérobiose.

Une autre possibilité consiste à laisser la boue sédimenter ou à la centrifuger (par exemple à 1 100 g pendant 10 mn) après avoir éliminé toutes les grosses particules. Écarter le surnageant. La boue peut être lavée dans le milieu minéral. Mettre la boue concentrée en suspension dans un milieu minéral de telle sorte que la concentration soit comprise entre 3 et 5 g/1 de matière en suspension. Aérer la suspension jusqu'à son utilisation.

Les boues doivent provenir d'une station conventionnelle fonctionnant bien. Si elles proviennent d'une station d'épuration dont le débit est important ou si elles sont susceptibles de contenir des inhibiteurs, elles doivent être lavées. Laisser sédimenter ou centrifuger la boue remise en suspension par une agitation vigoureuse, écarter le surnageant et remettre la boue lavée en suspension dans un milieu minéral frais. Répéter cette opération jusqu'à ce que l'on puisse considérer que la boue est exempte d'inhibiteur et de substrat en excès.

Prélever un échantillon de boue remise en suspension ou de boue non traitée juste avant son utilisation afin de déterminer le poids sec des matières solides en suspension.

Une autre possibilité consiste à homogénéiser la boue activée (entre 3 et 5 g/l de matière solide en suspension) à l'aide d'un agitateur mécanique pendant 2 minutes à vitesse moyenne. Laisser décanter la boue homogénéisée pendant 30 minutes ou plus si besoin est, et prélever la phase liquide, qui sera utilisée comme inoculum à raison de 10 ml/1 de milieu minéral.

I.6.4.2. *Autres sources d'inoculum*

L'inoculum peut provenir de l'effluent secondaire d'une station d'épuration ou d'une installation à l'échelle du laboratoire qui reçoit principalement des eaux ménagères. Recueillir un échantillon frais qui doit être maintenu en aérobiose pendant le transport. Laisser reposer pendant une heure ou filtrer à l'aide d'un papier filtre grossier et conserver le surnageant transvasé ou le filtrat en aérobiose jusqu'au moment de son utilisation. On peut utiliser jusqu'à 100 ml de ce type d'inoculum par litre de milieu.

▼B

L'eau de surface peut constituer une autre source d'inoculum. Dans ce cas, recueillir un échantillon d'une eau de surface appropriée, par exemple de rivière ou de lac, et le maintenir en aérobiose jusqu'au moment de son utilisation. Si nécessaire, concentrer l'inoculum par filtration ou par centrifugation.

I.6.5. **Préconditionnement des inoculums**

Les inoculums peuvent être préconditionnés aux conditions expérimentales, mais non préadaptés au produit à étudier. Le préconditionnement consiste à aérer la boue activée dans un milieu minéral, ou l'effluent secondaire pendant une durée de 5 à 7 jours à la température de l'essai. Le préconditionnement permet parfois d'améliorer la précision des méthodes d'essai en réduisant les valeurs dans les essais à blanc. Il est inutile de préconditionner les inoculums destinés à l'essai MITI.

I.6.6. **Contrôles abiotiques**

Rechercher, si nécessaire, une dégradation abiotique éventuelle de la substance à étudier en déterminant la disparition du COD, la consommation d'oxygène ou le dégagement de dioxyde de carbone dans des témoins stériles ne contenant pas d'inoculum. La stérilisation est effectuée par filtration à travers une membrane (0,2 à 0,45 μm) ou par addition d'une substance toxique adéquate à une concentration appropriée. Si la filtration sur membrane est utilisée, prélever les échantillons de façon aseptique pour maintenir la stérilité. À moins que l'adsorption de la substance à étudier ait pu être exclue a priori, des essais où la biodégradation est mesurée par l'élimination de COD doivent comporter, particulièrement lorsqu'il s'agit d'inoculums provenant de boues activées, un témoin abiotique qui sera inoculé et additionné de l'agent stérilisant.

I.6.7. **Nombre de fioles**

Le nombre de fioles d'une série type est précisé dans les chapitres consacrés à ces essais.

Des fioles de type suivant peuvent être utilisées:

— pour la suspension d'essai: contenant la substance à étudier et l'inoculum,

— pour le blanc inoculum: ne contenant que l'inoculum,

— pour le contrôle de la procédure: contenant la substance de référence et l'inoculum,

— pour le témoin abiotique stérile: stérile et ne contenant que le produit à étudier (voir point I.6.6),

— pour le contrôle de l'adsorption: contenant la substance à étudier, l'inoculum et l'agent stérilisant,

— pour le contrôle de toxicité: contenant le produit à étudier, le produit de référence et l'inoculum.

Il est obligatoire de suivre le COD et/ou les autres paramètres parallèlement dans la suspension d'essai et dans l'essai à blanc contenant l'inoculum. Il est souhaitable de suivre également le COD en parallèle dans les autres fioles.

Toutefois, il se peut que cela ne soit pas toujours possible. S'assurer que le nombre d'échantillons ou de lectures est suffisant pour permettre de déterminer le pourcentage de disparition au cours de l'intervalle de temps de 10 jours.

▼B

I.7. ÉVALUATION DES DONNÉES

Le pourcentage de dégradation, D_t, est calculé à l'aide des valeurs moyennes des doubles déterminations du paramètre dans le récipient d'essai et dans le blanc contenant l'inoculum. Les formules sont décrites dans les chapitres consacrés à chaque essai. L'évolution de la dégradation est représentée graphiquement sur un diagramme indiquant l'intervalle de temps de 10 jours. Calculer et mentionner dans le rapport le pourcentage de disparition au terme de l'intervalle de temps de 10 jours et la valeur obtenue au plateau ou à la fin de l'essai, selon les cas.

Dans les essais de respirométrie, des composés contenant de l'azote peuvent affecter la consommation d'oxygène en raison de la nitrification (voir annexes II et V).

I.7.1. **Estimation de la dégradation à l'aide de la détermination du COD**

Pour pouvoir vérifier la validité de l'essai (voir I.5.2), le pourcentage de dégradation (D_t) à chaque instant t de prise d'un échantillon doit être calculé séparément pour les fioles contenant la substance à étudier en utilisant les valeurs moyennes de mesures en double du COD. Il se calcule à l'aide de la formule suivante:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

où:

D_t = % de dégradation au temps t,

C_o = concentration initiale moyenne de COD dans le milieu de culture ensemencé contenant la substance à étudier (mg COD/1),

C_t = concentration moyenne de COD dans le milieu de culture ensemencé contenant la substance à étudier, au temps t (mg COD/I),

C_{bo} = concentration initiale moyenne de COD dans l'essai à blanc (milieu minéral ensemencé) (mg COD/1),

C_{bt} = concentration moyenne de COD dans l'essai à blanc (milieu minéral ensemencé) au temps t (mg COD/1).

Toutes les concentrations sont mesurées expérimentalement.

I.7.2. **Estimation de la dégradation à l'aide d'analyses spécifiques**

Lorsque l'on dispose de données analytiques spécifiques, la biodégradation primaire est calculée grâce à la formule suivante:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

où:

D_t = % de dégradation au temps t, soit normalement le 28^e jour,

S_a = quantité résiduelle de produit soumis à l'essai dans le milieu ensemencé à l'issue de l'essai (mg),

S_b = quantité résiduelle de produit à étudier dans l'essai à blanc constitué d'eau/milieu auquel on aura uniquement ajouté le produit à étudier (mg).

▼B

I.7.3. **Dégradation abiotique**

Lorsqu'on utilise un témoin abiotique stérile, le pourcentage de dégradation abiotique se calcule par la formule:

$$\% \text{ de dégradation abiotique} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

où:

$C_{s(o)}$ = concentration en COD dans le témoin stérile au temps 0,

$C_{s(t)}$ = concentration en COD dans le témoin stérile au temps t.

I.8. RAPPORT

Le procès-verbal d'essai devra, si possible, comporter les renseignements suivants:

— produits à étudier et produits de référence ainsi que leur degré de pureté,

— conditions de l'essai,

— inoculum: nature et lieu(x) de prélèvement, concentration ainsi que tout traitement de préconditionnement,

— proportion et nature des déchets industriels présents dans les eaux d'égout, si elles sont connues,

— durée et température de l'essai,

— dans le cas où les produits à étudier sont faiblement solubles, le traitement appliqué,

— méthode d'essai appliquée; il convient de fournir les raisons scientifiques et l'explication de toute modification du mode opératoire,

— fiche de données,

— tout phénomène d'inhibition observé,

— toute dégradation abiotique observée,

— les données concernant les analyses chimiques spécifiques, si elles sont disponibles,

— les données concernant les analyses de substances intermédiaires, si elles sont disponibles,

— la courbe représentant le pourcentage de dégradation en fonction du temps pour les substances soumises à l'essai et les substances de référence; la phase de latence, la phase de dégradation, l'intervalle de temps de 10 jours et la pente doivent être clairement indiqués (annexe I). Si l'essai a satisfait les critères de validité, on peut utiliser la moyenne des pourcentages de dégradation des fioles contenant la substance à étudier pour la courbe,

— le pourcentage de disparition à l'issue de l'intervalle de temps de 10 jours et au plateau ou à la fin de l'essai.

PARTIE II. **ESSAI DE DISPARITION DU COD** (Méthode C.4.-A)

II.1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Un volume mesuré de milieu minéral ensemencé, contenant une concentration connue de substance à étudier (10 à 40 mg/l de COD) comme seule source de carbone organique, est aéré dans l'obscurité ou sous une lumière diffuse, à 22 ± 2 °C.

▼B

La dégradation est suivie en analysant le COD à des intervalles fréquents pendant une durée de 28 jours. Le degré de biodégradation est calculé en exprimant la concentration de COD disparu (à laquelle on apportera une correction correspondant à la concentration de COD disparu dans l'essai à blanc contenant l'inoculum) en pourcentage de la concentration initiale. Le taux de biodégradation primaire peut également être calculé à partir d'analyses chimiques supplémentaires effectuées au début et à la fin de l'incubation.

II.2. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

II.2.1 **Appareillage**

a) des fioles coniques, d'une contenance comprise, par exemple, entre 250 ml et 2 1, selon le volume requis pour l'analyse du COD;

b) un dispositif d'agitation adapté aux fioles coniques, soit muni d'un système automatique de contrôle de température, soit placé dans une pièce thermostatée, et permettant de maintenir des conditions d'aérobiose dans toutes les fioles;

c) un dispositif de filtration équipé des membranes adéquates;

d) un analyseur du carbone organique dissous;

e) un appareil de mesure de l'oxygène dissous;

f) une centrifugeuse.

II.2.2. **Préparation du milieu minéral**

Pour la préparation de la solution mère, voir I.6.2.

Mélanger 10 ml de solution a) avec 800 ml d'eau de dilution, ajouter 1 ml des solutions b) à d) et compléter le volume à 1 l avec l'eau de dilution.

II.2.3. **Préparation et préconditionnement de l'inoculum**

L'inoculum peut provenir de plusieurs sources: boues activées, effluents, eaux de surface, sols ou d'un mélange de celles-ci.

Voir I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 et I.6.5.

II.2.4. **Préparation des fioles**

Exemple: verser un volume de 800 ml de milieu minéral par fiole conique de 2 1 et ajouter dans des fioles distinctes un volume suffisant de solution mère de substance d'essai ou de substance de référence pour que la concentration de la substance corresponde à une concentration en COD comprise entre 10 et 40 mg/l. Vérifier le pH et l'ajuster, si nécessaire, à une valeur de 7,4. Ensemencer les flacons avec de la boue activée ou avec un inoculum provenant d'une autre source (voir I.6.4.), de telle sorte que la concentration finale n'excède pas 30 mg/l de matière solide en suspension. Préparer également des témoins constitués de milieu minéral contenant l'inoculum mais sans substance d'essai ni substance de référence.

Ajouter, si nécessaire, une fiole pour la détection d'un éventuel effet inhibiteur de la substance d'essai. Pour cela, ensemencer une solution contenant des concentrations, à la fois de produit à étudier et de produit de référence, identiques à celles des autres fioles.

Ajouter, si besoin est, une fiole supplémentaire stérile, contenant une solution de produit non ensemencée afin de vérifier si la substance soumise à l'essai subit une dégradation abiatique (voir I.6.6).

▼B

De surcroît, si le produit à étudier est suspecté de s'adsorber de manière importante sur le verre, la boue, etc., il convient d'effectuer des mesures préliminaires permettant d'évaluer l'importance probable de cette adsorption et par conséquent de déterminer si l'essai convient pour la substance concernée (voir tableau 1). Préparer une fiole contenant la substance à étudier, l'inoculum et l'agent stérilisant.

Compléter le volume à 1 l dans toutes les fioles, avec le milieu minéral, mélanger, puis prélever un échantillon dans chaque fiole afin de déterminer la concentration initiale de COD (voir annexe II.4). Couvrir l'ouverture des fioles, par exemple avec du papier d'aluminium, de telle sorte que les échanges gazeux puissent s'effectuer librement entre la fiole et l'atmosphère environnante. Commencer ensuite l'essai en plaçant les fioles dans le dispositif d'agitation.

II.2.5. **Nombre de fioles d'une série type**

Fioles 1 et 2: suspension, d'essai

Fioles 3 et 4: blanc inoculum

Fiole 5: contrôle de la procédure

et de préférence et si nécessaire:

Fiole 6: témoin abiotique stérile

Fiole 7: contrôle de l'adsorption

Fiole 8: témoin de toxicité

Voir également I.6.7.

II.2.6. **Déroulement de l'essai**

Pendant l'essai, les concentrations de COD font l'objet de doubles déterminations à des intervalles de temps définis, suffisamment fréquents pour permettre de déterminer le début de l'intervalle de temps de 10 jours et le pourcentage de disparition au terme de cette période. Pour chaque détermination, il ne faut prélever que le volume de suspension d'essai strictement nécessaire.

Avant chaque prélèvement, le cas échéant, compenser les pertes dues à l'évaporation dans les fioles par ajout de la quantité nécessaire d'eau de dilution (I.6.1). Avant de prélever un échantillon, le milieu de culture est soigneusement mélangé et les substances adhérant aux parois du récipient doivent être dissoutes ou mises en suspension. Les échantillons sont immédiatement filtrés à travers une membrane ou centrifugés (voir annexe II.4); ils sont analysés le jour même; si tel n'est pas le cas, il faut les conserver entre 2 et 4 ^{o}C pendant un maximum de 48 heures, ou au-dessous de — 18 ^{o}C au-delà de 48 heures.

II.3. RÉSULTATS ET RAPPORT

II.3.1. **Traitement des résultats**

Calculer le pourcentage de dégradation au temps t, selon les indications figurant au point I.7.1 (détermination du COD) et, éventuellement, au point I.7.2 (analyse spécifique facultative).

Reporter tous les résultats sur les fiches de données fournies.

▼B

II.3.2. **Validité des résultats**

Voir I.5.2.

II. **3.3. Rapport**

Voir I.8.

II.4. FICHE DE DONNÉES

Un exemple de fiche de données est fourni ci-dessous.

ESSAI DE DISPARITION DU COD

1. **LABORATOIRE**

2. **DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI**

3. **SUBSTANCE À ÉTUDIER**

Nom:

Concentration de la solution mère: …mg/l produit

Concentration initiale dans le milieu, t_o: …mg/l produit

4. **INOCULUM**

Origine:

Traitement:

Préconditionnement éventuel:

Concentration des matières solides en suspension dans le mélange réactionnel: mg/l

5. **DÉTERMINATION DU CARBONE**

Analyseur de carbone:

	Fiole n°		COD après n jours (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Substance à étudier plus inoculum	1	a_1					
		a_2					
		a, moyenne $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, moyenne $C_{b(t)}$					

▼B

	Fiole n°		COD après n jours (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Essai à blanc avec l'inoculum et sans substance à étudier	3	C_1					
		C_2					
		c, moyenne $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, moyenne $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **ÉVALUATION DES DONNÉES BRUTES**

Fiole n°		% de dégradat. après n jours				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Moyenne (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Lorsque la différence entre les valeurs de D_1 et D_2 est trop grande, il ne faut pas calculer leur moyenne.

Note: Des tableaux similaires peuvent être utilisés pour les produits de référence et les témoins de toxicité.

7. **CONTRÔLE ABIOTIQUE** (facultatif)

	Durée (en jours)	
	0	t
Concentration de COD (mg/l) dans le témoin stérile	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ de dégradation abiotique} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ANALYSE SPÉCIFIQUE** (facultative)

	quantité résiduelle de substance à étudier	% de dégradation primaire
Témoin stérile	S_b	

▼B

	quantité résiduelle de substance à étudier	% de dégradation primaire
Milieu d'essai contaminé	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTIE III. **ESSAI DE SCREENING MODIFIÉ DE L'OCDE** (Méthode C.4-B)

III.1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Un volume mesuré de milieu minéral contenant une concentration connue de substance à étudier (de 10 à 40 mg/l COD) comme unique source de carbone organique est ensemencé avec un volume de 0,5 ml d'effluent par litre de milieu. Le mélange est aéré à 22 ± 2 °C dans l'obscurité ou sous une lumière diffuse.

La dégradation est suivie grâce à l'analyse du COD à des intervalles rapprochés pendant une période de 28 jours. Le taux de biodégradation est calculé en exprimant la concentration en COD disparu (corrigé en fonction de la quantité de COD disparu dans l'essai à blanc avec l'inoculum) en pourcentage de la concentration initiale. Le taux de dégradation primaire peut également être calculé à partir d'analyses chimiques supplémentaires effectuées au début et à la fin de l'incubation.

III.2. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

III.2.1. **Appareillage**

a) des fioles coniques, d'une contenance comprise, par exemple, entre 250 ml et 2 1, selon le volume requis pour l'analyse du COD;

b) un dispositif d'agitation adapté aux fioles coniques, soit muni d'un système automatique de contrôle de température, soit placé dans une pièce thermostatée, et permettant de maintenir des conditions d'aérobiose dans toutes les fioles;

c) un appareillage de filtration, accompagné des membranes adéquates;

d) un analyseur du carbone organique dissous;

e) un appareil de mesure de l'oxygène dissous;

f) une centrifugeuse.

III.2.2. **Préparation du milieu minéral**

Pour la préparation de la solution mère, voir I.6.2.

Mélanger 10 ml de solution a) avec 800 ml d'eau de dilution, ajouter 1 ml des solutions b) à d) et compléter le volume à 1 1 avec de l'eau de dilution.

Cette méthode ne nécessitant que 0,5 ml/1 d'effluent comme inoculum, le milieu doit par conséquent être enrichi en oligoéléments et facteurs de croissance. On ajoute pour cela 1 ml de chacune des solutions ci-après par litre de milieu final.

▼B

Solution d'oligoéléments:

Sulfate de manganèse tétrahydraté, $MnSO_4 . 4H_2O$	39,9 mg
Acide borique, H_3BO_3	57,2 mg
Sulfate de zinc heptahydraté, $ZnSO_4 . 7H_2O$	42,8 mg
Heptamolybdate d'ammonium $(NH_4)_6 MO_7O_{24}$	34,7 mg
Fer-chélaté ($FeCl_3$, EDTA)	100,0 mg

Dissoudre et compléter le volume à 1 l avec l'eau de dilution.

Solution de vitamines:

Extrait de levure	15,0 mg

Dissoudre l'extrait de levure dans 100 ml d'eau. Stériliser par passage à travers une membrane de porosité de 0,2 nm ou préparer une solution fraîche.

III.2.3. **Préparation et préconditionnement de l'inoculum**

L'inoculum provient de l'effluent secondaire d'une station d'épuration ou d'une unité pilote qui reçoit essentiellement des eaux ménagères. Voir I.6.4.2 et I.6.5.

On en utilise 0,5 ml par litre de milieu minéral.

III.2.4. **Préparation des fioles**

Exemple: verser un volume de 800 ml de milieu minéral par fiole conique de 2 l et ajouter dans des fioles distinctes des volumes de solution mère de substance à étudier et de substance de référence tels que la concentration du produit soit comprise entre 10 et 40 mg/l de COD. Vérifier le pH et l'ajuster, si nécessaire, à une valeur de 7,4. Ensemencer les fioles avec un volume de 0,5 ml/l d'effluent d'eau d'égout (voir I.6.4.2). Préparer également des témoins en ajoutant l'inoculum au milieu minéral, mais sans addition de substance d'essai ou de substance de référence.

Ajouter, si nécessaire, une fiole pour mesurer un éventuel effet inhibiteur de la substance à étudier. Pour cela, ensemencer une solution contenant des concentrations de produit à étudier et de produit de référence identiques à celles des autres fioles.

Ajouter également, si besoin est, une fiole supplémentaire, stérile, contenant une solution de substance non ensemencée afin de vérifier si la substance à étudier subit une dégradation abiotique (voir I.6.6).

De surcroît, si le produit à étudier est suspecté de s'adsorber de manière importante sur le verre, la boue, etc., il convient d'effectuer des mesures préliminaires permettant de déterminer l'importance vraisemblable de l'adsorption et d'évaluer par conséquent si l'essai convient pour la substance concernée (voir tableau 1). Préparer une fiole contenant la substance à étudier, l'inoculum et l'agent stérilisant.

Compléter le volume à 1 l dans toutes les fioles, avec le milieu minéral, mélanger, puis prélever un échantillon dans chaque flacon afin de déterminer la concentration initiale de COD (voir annexe II.4). Recouvrir les fioles avec une feuille d'aluminium, par exemple, de telle sorte que les échanges gazeux puissent s'effectuer librement entre la fiole et l'atmosphère environnante. Commencer ensuite l'essai en plaçant les récipients dans le dispositif d'agitation.

▼B

III.2.5. **Nombre de fioles d'une série type**

Fioles 1 et 2: suspension d'essai

Fioles 3 et 4: blanc inoculum

Fiole 5: contrôle de la procédure

et de préférence et si besoin est:

Fiole 6: témoin abiotique stérile

Fiole 7: contrôle de l'adsorption

Fiole 8: témoin de toxicité

Voir également I.6.7.

III.2.6. **Déroulement de l'essai**

Au cours de l'essai, les concentrations de COD dans chaque fiole font l'objet d'une double détermination à des intervalles de temps définis, suffisamment fréquents pour permettre de déterminer le début de l'intervalle de temps de 10 jours et le pourcentage de disparition au terme de cette période. Pour chaque détermination, il ne faut prélever que le volume strictement nécessaire.

Avant chaque prélèvement, le cas échéant, compenser les pertes dues à l'évaporation dans les fioles par ajout de la quantité nécessaire d'eau de dilution (I.6.1). Avant de prélever un échantillon, le milieu de culture est soigneusement mélangé et les substances adhérant aux parois des récipients sont dissoutes ou mises en suspension. Les échantillons sont immédiatement filtrés à travers une membrane ou centrifugés (voir annexe II.4). Ils sont analysés le jour même, si tel n'est pas le cas, il faut les conserver entre 2 et 4 ^{o}C pendant un maximum de 48 heures, ou au-dessous de — 18 ^{o}C au-delà de 48 heures.

III.3. RÉSULTATS ET RAPPORT

III.3.1. **Traitement des résultats**

Calculer le pourcentage de dégradation au temps t, selon les indications figurant au point I.7.1 (détermination du COD) et, éventuellement, au point I.7.2 (analyse spécifique facultative).

Reporter tous les résultats sur les fiches de données fournies.

III.3.2. **Validité des résultats**

Voir I.5.2.

III. 3.3. **Rapport**

Voir I.8.

III.4. FICHE DE DONNÉES

Un exemple de fiche de données est présenté ci-après.

ESSAI DE TRIAGE DE L'OCDE MODIFIÉ

1. **LABORATOIRE**

2. **DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI**

▼B

3. **SUBSTANCE À ÉTUDIER**

Nom:

Concentration de la solution mère: mg/l produit

Concentration initiale dans le milieu, t_o: mg/l produit

4. **INOCULUM**

Origine:

Traitement:

Préconditionnement éventuel:

Concentration des matières solides en suspension dans le mélange réactionnel: mg/l

5. **DÉTERMINATION DU CARBONE**

Analyseur de carbone:

	Fiole n°		COD après n jours (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Substance à étudier plus inoculum	1	a_1					
		a_2					
		a, moyenne $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, moyenne $C_{b(t)}$					
Essai à blanc avec l'inoculum et sans substance à étudier	3	C_1					
		C_2					
		c, moyenne $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, moyenne $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **ÉVALUATION DES DONNÉES BRUTES**

Fiole n°		% de dégradat. après n jours				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Fiole n°		% de dégradat. après n jours				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Moyenne (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Il ne faut pas calculer la moyenne de D_1 et D_2 lorsque la différence entre leurs valeurs est trop grande.

Note: Des tableaux similaires peuvent être utilisés pour les produits de référence et les témoins de toxicité.

7. **CONTRÔLE ABIOTIQUE** (facultatif)

	Durée (en jours)	
	0	t
Concentration de COD (mg/l) dans le témoin stérile	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ de dégradation abiotique} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ANALYSE SPÉCIFIQUE** (facultative)

	quantité résiduelle de substance à étudier	% de dégradation primaire
Témoin stérile	S_b	
Milieu d'essai contaminé	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTIE IV. ESSAI DE DÉGAGEMENT DE CO_2 (Méthode C.4-C)

IV.1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Un volume mesuré de milieu minéral ensemencé, contenant une concentration connue de la substance à étudier (10 à 20 mg/l de COD ou de COT) comme seule source de carbone organique, est aéré par le passage d'air exempt de dioxyde de carbone, à un débit contrôlé et dans l'obscurité ou en lumière diffuse. La dégradation est suivie pendant une durée de 28 jours en déterminant le dioxyde de carbone produit, qui est piégé par de l'hydroxyde de sodium ou de baryum et mesuré par titration de l'hydroxyde résiduel ou en tant que carbone inorganique. La quantité de dioxyde de carbone produite à partir de la substance à étudier (corrigée en fonction de la quantité produite dans l'essai à blanc avec l'inoculum) est exprimée en pourcentage du CO_2Th. Le taux de biodégradation peut également être calculé à partir d'analyses supplémentaires du COD effectuées au début et à la fin de l'incubation.

▼B

IV.2. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

IV.2.1. **Appareillage**

a) des fioles d'une contenance de 2 à 5 litres, munies d'un tube d'aération atteignant presque le fond du récipient et d'un orifice de sortie;

b) des agitateurs magnétiques pour les essais avec des substances peu solubles;

c) des flacons absorbeurs de gaz;

d) un dispositif de contrôle et de mesure du débit d'air;

e) un appareil de lavage du dioxyde de carbone, permettant d'obtenir de l'air exempt de dioxyde de carbone; une autre possibilité consiste à utiliser un mélange d'oxygène et d'azote exempts de CO_2, provenant de bouteilles de gaz, dans des proportions adéquates (20 % O_2, 80 % N_2);

f) un dispositif de mesure du dioxyde de carbone, soit par titrimétrie, soit à l'aide d'un analyseur de carbone inorganique quelconque;

g) un dispositif de filtration sur membrane (facultatif);

h) un analyseur de COD (facultatif).

IV.2.2. **Préparation du milieu minéral**

Pour la préparation des solutions mères, voir I.6.2.

Mélanger 10 ml de solution a) et 800 ml d'eau de dilution, ajouter 1 ml des solutions b) à d) et compléter le volume à 1 l avec l'eau de dilution.

IV.2.3. **Préparation et préconditionnement de l'inoculum**

L'inoculum peut provenir de plusieurs sources: boues activées — effluents — eaux de surface — sols — ou d'un mélange de celles-ci.

Voir I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 et I.6.5.

IV.2.4. **Préparation des fioles**

Les volumes et poids cités ci-après à titre d'exemple indiquent des valeurs correspondant à des fioles de 5 l contenant 3 l de suspension. Si de plus petits volumes sont utilisés, il convient de modifier les valeurs en conséquence, mais en s'assurant que le dioxyde de carbone formé peut être mesuré avec précision.

Verser 2 400 ml de milieu minéral dans chaque fiole de 5 l. Ajouter un volume approprié de boue activée préparée au préalable (voir I.6.4.1 et I.6.5) tel que la concentration des matières en suspension n'excède pas 30 mg/l dans le volume final de 3 l de mélange ensemencé. Une autre possibilité consiste à diluer d'abord la boue préparée jusqu'à obtention d'une suspension de 500 à 1 000 mg/l dans le milieu minéral, puis à ajouter une partie aliquote de cette suspension dans la fiole de 5 l, de manière à atteindre une concentration de 30 mg/l; cette méthode permet une plus grande précision. On peut utiliser des inoculums d'origines différentes (voir I.6.4.2).

Éliminer le dioxyde de carbone du mélange ensemencé par barbotage d'air exempt de CO_2, pendant une nuit.

▼B

Ajouter séparément des volumes connus de solutions mères de la substance d'essai et de la substance de référence dans des fioles préparées en double, de telle sorte que la concentration de COD ou de COT, provenant des substances ajoutées, soit comprise entre 10 et 20 mg/l; conserver quelques fioles sans addition de substance comme témoins d'ensemencement. Si la substance à étudier est peu soluble, il convient d'ajouter directement un poids ou un volume défini, ou de procéder selon les indications données à l'annexe III.

Ajouter, si nécessaire, une fiole pour mesurer un éventuel effet inhibiteur de la substance à étudier. Pour cela, ensemencer une solution contenant des concentrations du produit à étudier et du produit de référence identiques à celles des autres fioles.

Ajouter également, si besoin est, une fiole supplémentaire stérile, contenant une solution de produit non ensemencée afin de vérifier si la substance d'essai subit une dégradation abiotique (voir I.6.6). Stériliser par addition d'une substance toxique à une concentration appropriée.

Compléter le volume des suspensions à 3 litres, dans toutes les fioles, avec le milieu minéral aéré au préalable au moyen d'air exempt de CO_2. Des échantillons peuvent (facultatif) être prélevés afin d'analyser le COD (voir annexe II.4) et/ou d'effectuer une analyse spécifique. Relier les flacons absorbeurs à l'orifice de sortie d'air des fioles.

Si l'on utilise de l'hydroxyde de baryum, à chacune des fioles de 5 litres, relier en série trois flacons absorbeurs, contenant chacun 100 ml d'une solution 0,0125 M d'hydroxyde de baryum. La solution ne doit contenir ni sulfate ni carbonate précipité et il convient d'en déterminer la teneur juste avant son utilisation. Si l'on utilise de l'hydroxyde de sodium, relier deux pièges, le second servant de contrôle pour montrer que tout le dioxyde de carbone a été absorbé dans le premier. On pourra utiliser des flacons absorbeurs munis de systèmes de fermeture pour flacons de sérum. Ajouter dans chaque flacon 200 ml d'hydroxyde de sodium 0,05 M, ce qui suffit à absorber la totalité du dioxyde de carbone dégagé lors de la dégradation complète de la substance à étudier. La solution d'hydroxyde de sodium, même fraîchement préparée, contiendra des traces de carbonate; il convient donc d'effectuer une correction en déduisant la quantité de carbonate présente dans le témoin.

IV.2.5. **Nombre de fioles d'une série type**

Fioles 1 et 2: suspension d'essai

Fioles 3 et 4: blanc inoculum

Fiole 5: contrôle de la procédure

et de préférence et si nécessaire:

Fiole 6: témoin abiotique stérile

Fiole 7: témoin de toxicité

Voir également I.6.7.

IV.2.6. **Déroulement de l'essai**

Commencer l'essai en faisant barboter de l'air exempt de CO_2 dans les suspensions à un débit de 30-100 ml/min. Prélever régulièrement des échantillons de l'absorbant de dioxyde de carbone pour en analyser la teneur en CO_2. Il est conseillé d'effectuer des analyses tous les deux ou trois jours pendant les dix premiers jours, puis ensuite tous les cinq jours jusqu'au 28^{e} jour de telle sorte que l'intervalle de temps de 10 jours puisse être identifié.

▼B

Le 28e jour, prélever des échantillons (facultatif) pour analyser le COD et/ou effectuer une analyse spécifique, mesurer le pH des suspensions et ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré à chaque fiole; aérer la fiole pendant une nuit pour éliminer le dioxyde de carbone présent dans la suspension d'essai. Le 29e jour, analyser pour la dernière fois le dégagement de dioxyde de carbone.

Les jours où l'on effectue les mesures de CO_2, détacher le flacon absorbeur contenant de l'hydroxyde de baryum le plus proche de la fiole d'essai et titrer la solution d'hydroxyde de baryum à l'aide d'HCl 0,05 M en utilisant la phénolphtaléine comme indicateur. Rapprocher les autres flacons absorbeurs en les décalant d'une place et introduire un nouveau flacon absorbeur contenant 100 ml d'hydroxyde de baryum 0,0125 M frais à l'extrémité de la série. Effectuer les titrations nécessaires, par exemple lorsqu'une précipitation importante se produit dans le premier piège et avant qu'elle n'apparaisse dans le second, ou au moins une fois par semaine. Une autre possibilité consiste à utiliser le NaOH comme absorbant et à prélever à l'aide d'une seringue un échantillon de faible volume (en fonction du type d'analyseur de carbone utilisé) de la solution d'hydroxyde de sodium qui se trouve dans le flacon absorbeur le plus proche de la fiole. Injecter l'échantillon dans la partie CI de l'analyseur de carbone pour analyser directement le dioxyde de carbone dégagé.

N'analyser le contenu du second piège qu'à la fin de l'essai afin d'apporter une correction correspondant à tout passage de dioxyde de carbone dans ce piège.

IV.3. RÉSULTATS ET RAPPORT

IV.3.1. **Traitement des résultats**

Lorsqu'une titration est effectuée, la quantité de CO_2 piégée dans un flacon absorbeur est calculée à l'aide de la formule suivante:

$$\text{mg } CO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

où:

V = volume de HC1 utilisé pour la titration des 100 ml contenus dans le flacon absorbeur (ml),

C_B = concentration de la solution d'hydroxyde de baryum (M),

C_A = concentration de la solution d'acide chlorhydrique (M),

si C_B est 0,0125 M et C_A est 0,05 M, la titration d'un volume de 100 ml d'hydroxyde de baryum est de 50 ml et le poids de CO_2 est donné par la formule suivante:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml d'HCl titré} = 1{,}1 \times \text{ml HCl}$$

Ainsi, dans ce cas, le facteur permettant de convertir le volume d'HCl titré en mg de CO_2 est égal à 1,1.

Calculer le poids de CO_2 produit par l'inoculum seul et par l'inoculum plus la substance à étudier à l'aide des valeurs de titration obtenues dans les deux cas; la différence correspond au poids de CO_2 produit à partir de la substance à étudier seule.

Exemple: si la titration du flacon absorbeur correspondant à l'inoculum seul nécessite un volume de 48 ml et celui du flacon correspondant à l'inoculum additionné à la substance, un volume de 45 ml:

CO_2 de l'inoculum = 1,1 × (50-48) = 2,2 mg

▼B

CO_2 de l'inoculum plus substance à étudier = 1,1 × (50-45) = 5,5 mg

et par conséquent le poids de CO_2 produit à partir de la substance à étudier est égal à 3,3 mg.

Le pourcentage de dégradation est calculé à l'aide de la formule suivante:

$$\% \text{ de dégradation} = \frac{\text{mg } CO_2\text{produit} \times 100}{CO_2\text{Th} \times \text{mg substance à étudier ajoutée}}$$

ou

$$\% \text{ de dégradation} = \frac{\text{mg } CO_2 \times 100}{\text{mg de COT ajouté dans l'essai} \times 3{,}67}$$

où 3,67 est le facteur de conversion (44/12) du carbone en dioxyde de carbone.

Calculer le pourcentage de dégradation après un temps déterminé en effectuant la somme des pourcentages de CO_2Th calculés pour chaque jour où des mesures ont été effectuées pendant la période considérée.

Lorsque l'absorbant utilisé est de l'hydroxyde de sodium, calculer la quantité de dioxyde de carbone produite, exprimée en CI (mg), en multipliant la concentration en CI dans l'absorbant par le volume de ce dernier.

Calculer le pourcentage de dégradation à l'aide de la formule suivante:

$$\% \ CO_2\text{Th} = \frac{\text{mg CI de la fiole d'essai} - \text{mg CI de la fiole témoin}}{\text{mg de COT ajouté sous forme de substance d'essai}} \times 100$$

Calculer la disparition du COD (facultatif) comme décrit au point I.7. Consigner ces résultats, ainsi que tout autre résultat, sur les fiches de données fournies.

IV.3.2 **Validité des résultats**

La teneur en CI de la suspension de substance à étudier en milieu minéral au début de l'essai doit être inférieure à 5 % du CT, et le dégagement total de CO_2 dans l'essai à blanc contenant l'inoculum ne doit normalement pas excéder 40 mg/l de milieu à la fin de l'essai. Si les valeurs obtenues sont supérieures à 70 mg/l de CO_2, les données et le protocole expérimental doivent être soumis à un examen critique.

Voir également I.5.2.

IV.3.3 **Rapport**

Voir I.8.

IV.4. FICHE DE DONNÉES

Un exemple de fiche de données est présenté ci-dessous.

ESSAI DE DÉGAGEMENT DE DIOXYDE DE CARBONE

1. **LABORATOIRE**

2. **DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI**

3. **SUBSTANCE À ÉTUDIER**

   Nom:

   Concentration de la solution mère: mg/l produit

▼B

Concentration initiale dans le milieu: mg/l produit

Carbone total ajouté dans la fiole: mg/l

CO_2Th: mg CO_2

4. **INOCULUM**

Origine:

Traitement:

Préconditionnement éventuel:

Concentration des matières solides en suspension dans le mélange réactionnel: mg/l

5. **PRODUCTION DE DIOXYDE DE CARBONE ET DÉGRADABILITÉ**

Méthode: $Ba(OH)_2$NaOH/autre

Temps (jours)	CO_2 formé Essai (mg)		CO_2 formé blanc (mg)		CO_2 formé cumulé (mg) (essai moins blanc)		% CO_2Th $\frac{CO_2\text{cumulé}}{CO_2\text{Th}} \times 100$		
	1 / 2	moy.	3 / 4	moy.	1	2	1	2	moy.
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Note: Des tableaux de ce type peuvent être utilisés pour le produit de référence et les témoins de toxicité.

6. **DÉTERMINATION DU CARBONE** (facultative)

Analyseur de carbone: ...

Temps (jours)	Blanc mg/l	Produit à étudier mg/l
0	$C_{b(o)}$	c_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	c_t

(*) ou à la fin de l'incubation

▼B

$$\% \text{ de COD éliminé} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_t - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **DÉGRADATION ABIOTIQUE** (facultative)

$$\% \text{ dégrad. abiot.} = \frac{\text{Format. de } CO_2 \text{ d. la fiole stérile ap. 28 jours (mg)}}{CO_2 \text{ Th (mg)}} \times 100$$

PARTIE V. **ESSAI DE RESPIROMÉTRIE MANOMÉTRIQUE** (Méthode C.4-D)

V.l. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Un volume mesuré de milieu minéral ensemencé, contenant une concentration connue de la substance d'essai (100 mg/l de substance d'essai, de telle sorte que la DThO soit au moins comprise entre 50 et 100 mg/l au moins) comme seule source de carbone organique, est agité en fiole fermée, à température constante (± 1 °C au maximum) pendant une durée maximale de 28 jours. La consommation d'oxygène est déterminée soit en mesurant la quantité d'oxygène (produit par électrolyse) nécessaire pour maintenir un volume gazeux constant dans la fiole respirométrique, soit en se basant sur les modifications de volume ou de pression (ou sur une combinaison des deux) dans l'appareil. Le dioxyde de carbone produit est absorbé par une solution d'hydroxyde de potassium ou par un autre absorbant approprié. La quantité d'oxygène consommée par la substance à étudier (après une correction correspondant à la quantité d'oxygène consommée par le témoin inoculum, analysée parallèlement) est exprimée en pourcentage de DThO ou de DCO. Facultativement, la biodégradation primaire peut également être calculée à partir d'analyses supplémentaires du COD effectuées au début et à la fin de l'incubation, et la biodégradation ultime par la mesure du COD.

V.2. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

V.2.1. **Appareillage**

a) un respiromètre approprié,

b) un dispositif de régulation de température d'une précision de ± 1 °C au moins,

c) un dispositif de filtration sur membrane (facultatif),

d) un analyseur de carbone (facultatif).

V.2.2. **Préparation du milieu minéral**

Pour la préparation des solutions mères, voir I.6.2.

Mélanger 10 ml de solution (a) et 800 ml d'eau de dilution, ajouter 1 ml des solutions (b) à (d) et compléter le volume à un litre avec l'eau de dilution.

V.2.3. **Préparation et préconditionnement de l'inoculum**

L'inoculum peut provenir de plusieurs sources: boues activées — effluents — eaux de surface — sols — ou d'un mélange de celles-ci.

Voir I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. et I.6.5.

V.2.4. **Préparation des fioles**

À partir des solutions mères, préparer différents lots de solutions de substance d'essai et de substance de référence dans du milieu minéral, normalement à une concentration de 100 mg/l de substance (ce qui donne une DThO comprise, au moins, entre 50 et 100 mg/l).

▼B

Calculer la DThO à partir de la formation de sels d'ammonium, à moins qu'un processus de nitrification ne soit prévisible, auquel cas le calcul reposera sur la formation de nitrate (voir annexe II.2.)

Mesurer le pH et, le cas échéant, l'ajuster à 7,4 ± 0,2.

Les substances faiblement solubles doivent être ajoutées lors d'une étape ultérieure (voir ci-après).

S'il convient de déterminer la toxicité de la substance à étudier, préparer une solution de milieu minéral supplémentaire contenant à la fois la substance de référence et le produit à étudier aux mêmes concentrations que dans les solutions ne contenant que l'un des produits.

Dans le cas où il est nécessaire de mesurer la consommation physico-chimique d'oxygène, préparer une solution de produit à étudier, dont la concentration corresponde normalement à une DThO de 100 mg/l, stérilisée par l'addition d'une substance toxique appropriée (voir I.6.6).

Ajouter dans deux fioles, au moins, le volume requis de solution d'essai et dans deux autres, au moins, le volume adéquat de solution de référence. Préparer d'autres fioles ne contenant que du milieu minéral (pour les témoins inoculum) et, le cas échéant, la solution de mélange produit à étudier/substance de référence et la solution stérile.

Si la substance à étudier est peu soluble, en ajouter un poids ou un volume déterminé, directement à ce stade, ou suivre le mode opératoire décrit à l'annexe III. Ajouter de l'hydroxyde de potassium, de la chaux sodée ou un autre absorbant dans les compartiments d'absorption du CO_2.

V.2.5. **Nombre de fioles d'une série type**

Fioles 1 et 2: suspension d'essai

Fioles 3 et 4: blanc inoculum

Fiole 5: contrôle de la procédure de préférence,

et si nécessaire:

Fiole 6: témoin stérile

Fiole 7: témoin de toxicité

Voir également I.6.7.

V.2.6. **Déroulement de l'essai**

Laisser les récipients atteindre la température souhaitée. Ensemencer les récipients appropriés avec les boues activées préparées au préalable ou avec un inoculum provenant d'une autre source, de telle sorte que la concentration des matières solides en suspension ne dépasse pas 30 mg/l. Assembler le matériel, mettre l'agitateur en marche, vérifier l'étanchéité à l'air et commencer à mesurer la consommation d'oxygène. Le déroulement de l'essai ne nécessite normalement aucune attention particulière en dehors des lectures et des vérifications quotidiennes permettant de s'assurer que la température et l'agitation appropriées sont maintenues.

Calculer la consommation d'oxygène à partir des lectures effectuées à intervalles réguliers et rapprochés en suivant la méthode fournie par le fabriquant du matériel utilisé. A la fin de l'incubation, qui est normalement de 28 jours, mesurer le pH dans les fioles, en particulier si la consommation d'oxygène est faible ou supérieure à la $DThO_{NH4}$ (pour les composés azotés).

▼B

Prélever, si nécessaire, des échantillons dans les fioles du respiromètre, au début et à la fin de l'essai, pour analyser le COD ou effectuer un dosage spécifique (voir annexe II.4.). Lors du premier prélèvement, noter le volume de suspension d'essai restant dans la fiole. Si la substance à étudier contient de l'azote, déterminer l'augmentation de la concentration de nitrite et de nitrate au cours de ces 28 jours et calculer la correction relative à la consommation d'oxygène due à la nitrification (annexe V).

V.3. RÉSULTATS ET RAPPORT

V.3.1. **Traitement des résultats**

Diviser la consommation d'oxygène (mg) de la substance à étudier après une période donnée (après correction due à l'oxygène consommé dans l'essai à blanc contenant l'inoculum pendant une période identique) par le poids de substance utilisé. Le résultat, exprimé en mg d'oxygène par mg de substance, correspond à la DBO, à savoir:

$$\text{DBO} = \frac{(\text{mg d}'O_2 \text{ consom. par le produit à étudier} - \text{mg } O_2 \text{ consom. par le blanc})}{(\text{mg de produit à étudier présent dans la fiole})}$$

= mg d'O_2 par mg de produit à étudier

Calculer le pourcentage de biodégradation, soit à partir de la formule suivante:

$$\%\text{ de biodégrad.} = \%\text{ DThO} = \frac{\text{DBO}(\text{mg } O_2/\text{mg substance})}{\text{DThO}(\text{mg } O_2/\text{mg substance})} \times 100,$$

soit à l'aide de celle-ci:

$$\%\text{ DCO} = \frac{\text{DBO}(\text{mg } O_2/\text{mg substance})}{\text{COD}(\text{mg } O_2/\text{mg substance})} \times 100$$

Il faut noter que ces deux méthodes n'aboutissant pas nécessairement au même résultat, il est préférable d'utiliser la première.

Pour les substances à étudier azotées, choisir la DThO appropriée (NH_4 ou NO_3) en fonction de ce que l'on sait ou suppose quant à la nitrification (annexe II.2.). Si la nitrification a lieu mais de manière incomplète, calculer la correction pour l'oxygène consommé par la nitrification à partir des modifications des concentrations de nitrite et de nitrate (annexe V).

Lorsque les mesures facultatives du carbone organique et/ou d'un produit spécifique sont effectuées, calculer le pourcentage de dégradation, comme décrit au paragraphe 1.7.

Consigner tous les résultats sur les fiches de données fournies.

V.3.2. **Validité des résultats**

La consommation d'oxygène dans l'essai à blanc contenant l'inoculum est normalement comprise entre 20 et 30 mg/l d'O_2 et ne doit pas dépasser 60 mg/l en 28 jours. Des valeurs supérieures à 60 mg/l nécessitent un examen critique des données et des méthodes expérimentales. Si la valeur du pH se situe en dehors de l'intervalle compris entre 6 et 8,5 et si la consommation d'oxygène par le produit à étudier est inférieure à 60 %, l'essai doit être recommencé avec une concentration en produit à étudier plus faible.

Voir également 1.5.2.

▼B

V.3.3. **Rapport**

Voir 1.8.

V.4. **FICHE DE DONNÉES**

Un exemple de fiche de données est présenté ci-après.

ESSAI DE RESPIROMÉTRIE MANOMÉTRIQUE

1. **LABORATOIRE**

2. **DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI**

3. **SUBSTANCE À ÉTUDIER**

Nom:

Concentration de la solution mère: … mg/l

Concentration initiale dans le milieu, C_o: … mg/l

Volume dans la fiole d'essai (V): … ml

DThO/DCO: … mg O_2/mg de produit à étudier (NH_4, NO_3)

4. **INOCULUM**

Origine: …

Traitement: …

Préconditionnement éventuel: …

Concentration des matières solides en suspension dans le mélange réactionnel: … mg/l

5. **CONSOMMATION D'OXYGÈNE: BIODÉGRADABILITÉ**

		Temps (jours)											
		0		7		14			21			28	
Cons. O_2 (mg) du produit à étudier	1												
	2												
	a, moy.												
Cons. O_2 (mg) du blanc	3												
	4												
	b, moy.												
DBO corr. (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
DBO par mg de substance d'essai	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Temps (jours)											
		0		7		14			21			28	
% de dégrad. $\frac{DBO}{DThO} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	Moyenne (*)												

V = volume de milieu dans la fiole d'essai
(*) Il ne faut pas calculer la moyenne de D_1 et D_2 lorsque la différence entre leurs valeurs est trop grande.

Note: Des tableaux de ce type peuvent être utilisés pour le produit de référence et les témoins de toxicité.

6. **CORRECTION TENANT COMPTE DE LA NITRIFICATION** (voir annexe V)

Jour		0	28	Différence
i)	Concentration de nitrate (mg N/l)			(N)
ii)	Équivalent oxygène (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
iii)	Concentration de nitrite (mg N/l)			(N)
(iv)	Équivalent oxygène (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
(ii + iv)	Total équivalent oxygène	—	—	

7. **ANALYSE DU CARBONE** (facultative)

Analyseur de carbone: ...

Temps (jour)	Blanc mg/l	Produit à étudier mg/l
0	(C_{blo})	(C_o)
28 (*)	(C_{blt})	(C_t)

(*) ou à la fin de l'incubation

$$\% \text{ de COD éliminé} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **ANALYSE SPÉCIFIQUE** (facultative)

S_b = concentration dans le témoin physico-chimique (stérile), le 28e jour.

S_a = concentration dans la fiole ensemencée, le 28e jour.

$$\% \text{ de biodégradation} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **DÉGRADATION ABIOTIQUE** (facultative)

a = consommation d'oxygène dans les fioles stériles au bout de 28 jours (mg).

$$\text{Consommation d'oxygène par mg de produit à étudier} = \frac{a}{C_o V}$$

▼B

(Voir paragraphe 1 et 3)

$$\% \text{ de dégradation abiotique} = \frac{a \times 100}{C_o V \times DThO}$$

PARTIE VI. **ESSAI EN FIOLES FERMÉES** (Méthode C.4-E)

VI.1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La solution de substance à étudier en milieu minéral, généralement d'une concentration de 2 à 5 mg/l, est ensemencée avec un nombre relativement faible de micro-organismes provenant d'une population hétérogène et conservée dans des fioles fermées et remplies complètement dans l'obscurité et à température constante. La dégradation est suivie par l'analyse de l'oxygène dissous pendant une période de 28 jours. La quantité d'oxygène consommé par la substance à étudier, corrigée en fonction de la consommation dans l'essai à blanc contenant l'inoculum réalisé dans la même série, est exprimée en pourcentage de DThO ou de DCO.

VI.2. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

VI.2.1. **Appareillage**

a) des flacons pour analyse de la DBO, munis de bouchons de verre, d'un volume de 250 à 300 ml,

b) un bain-marie ou un incubateur permettant de maintenir les fioles à température constante (± 1 °C au maximum) à l'abri de la lumière,

c) de grands flacons de verre (2 à 5 l) pour la préparation des milieux et le remplissage des flacons à DBO,

d) une électrode à oxygène couplée à un appareil de mesure, ou l'équipement et les réactifs nécessaires à la méthode de titration de Winkler.

VI.2.2. **Préparation du milieu minéral**

Pour la préparation des solutions mères, voir I.6.2.

Mélanger 1 ml des solutions a) à d) et compléter le volume à un litre avec l'eau de dilution.

VI.2.3. **Préparation de l'inoculum**

Normalement, l'inoculum provient de l'effluent secondaire d'une station d'épuration ou d'une unité pilote qui reçoit principalement des eaux ménagères. L'eau de surface peut constituer une autre source d'inoculum. Utiliser normalement une goutte (0,05 ml) à 5 ml de filtrat par litre de milieu; il peut être nécessaire de procéder à des essais afin de déterminer le volume optimal pour un effluent donné (voir I.6.4.2. et I.6.5.)

VI.2.4. **Préparation des fioles**

Aérer fortement le milieu minéral pendant au moins 20 mn. Chaque série d'essais doit être effectuée avec du milieu minéral provenant d'un lot unique. Le milieu est généralement prêt à l'emploi après être resté pendant 20 heures à la température de l'essai. Déterminer la concentration d'oxygène dissous à des fins de contrôle; la valeur obtenue doit être proche de 9 mg/l à 20 °C. Effectuer toutes les opérations de transfert et de remplissage avec le milieu saturé d'air en évitant la formation de bulles, par exemple à l'aide de siphons.

▼B

Préparer des lots parallèles de flacons à DBO pour les déterminations avec la substance d'essai et la substance de référence dans des séries expérimentales simultanées. Réunir un nombre suffisant de flacons à DBO, comprenant des essais à blanc avec l'inoculum, pour pouvoir effectuer, au moins en double, les mesures de la consommation d'oxygène aux intervalles de temps souhaités, par exemple après 0, 7, 14, 21 et 28 jours. Un plus grand nombre de flacons peut être nécessaire pour être sûr de pouvoir identifier l'intervalle de temps de 10 jours.

Transférer le milieu minéral parfaitement aéré dans les grands flacons de manière à remplir à peu près le tiers de leur volume. Ajouter ensuite dans de grands flacons distincts une quantité de solution mère du produit à étudier ou du produit de référence telle que la concentration finale ne dépasse pas, normalement, 10 mg/l. N'ajouter aucune substance dans le grand flacon destiné à l'essai à blanc.

Pour s'assurer que l'activité de l'inoculum n'est pas limitée, la concentration d'oxygène dissous ne doit pas descendre en-dessous de 0,5 mg/l dans les flacons à DBO. La concentration de produit à étudier se trouve ainsi limitée à environ 2 mg/l. Toutefois, on peut utiliser une concentration comprise entre 5 et 10 mg/l pour les composés peu dégradables et les composés dont la DThO est faible. Dans certains cas, il est préférable d'effectuer des séries d'essais en parallèle avec deux concentrations différentes, par exemple 2 et 5 mg/l. La DThO est normalement calculée à partir de la formation de sels d'ammonium, mais si l'on suppose ou si l'on est sûr qu'une nitrification doit avoir lieu, il convient alors de calculer la $DThO_{NO3}$ en se basant sur la formation de nitrate (voir annexe II.2). Toutefois, si une nitrification se produit mais sans être complète, il faut effectuer une correction tenant compte des modifications de la concentration de nitrite et de nitrate déterminées par l'analyse (voir annexe V).

Si la toxicité du produit à étudier doit être recherchée (dans le cas, par exemple, où une faible biodégradabilité aurait été observée au préalable), une autre série de flacons est nécessaire.

Préparer un autre grand flacon contenant du milieu minéral aéré (jusqu'au tiers de son volume environ) auquel on ajoute la substance à étudier et le produit de référence à des concentrations finales normalement égales à celles des autres grands flacons.

Ensemencer les solutions contenues dans les grands flacons avec un effluent secondaire (dont le volume est compris entre une goutte, soit environ 0,05 ml, et 5 ml) ou avec un inoculum d'une autre origine, comme de l'eau de rivière (voir I.6.4.2.). Enfin, compléter le volume des solutions avec du milieu minéral aéré à l'aide d'un tuyau touchant le fond du flacon pour permettre un mélange adéquat.

VI.2.5. **Nombre de fioles d'une série type**

Une série type comporte les flacons suivants:

— au moins 10 flacons contenant la substance à étudier et l'inoculum (suspension d'essai),

— au moins 10 flacons ne contenant que l'inoculum (essai à blanc avec l'inoculum),

— au moins 10 flacons contenant le produit de référence et l'inoculum (contrôle de la procédure),

▼B

— et, si nécessaire, 6 flacons contenant la substance à étudier, le produit de référence et l'inoculum (contrôle de toxicité). Néanmoins, pour être certain de pouvoir identifier l'intervalle de temps de 10 jours, il faudrait environ deux fois plus de flacons.

VI.2.6. Déroulement de l'essai

Toutes les solutions préparées sont immédiatement transférées dans le lot correspondant de flacons à DBO à l'aide d'un tuyau plongeant aux trois quarts (pas jusqu'au fond) du grand flacon approprié de telle sorte que tous les flacons à DBO soient complètement remplis. Tapoter doucement pour éliminer toutes les bulles d'air. L'oxygène dissous est analysé immédiatement dans les flacons destinés à la mesure au temps 0, par la méthode de Winkler ou avec une électrode. Le contenu des flacons peut être conservé en vue d'une analyse ultérieure par la méthode de Winkler si on lui ajoute du sulfate de manganèse (II) et de l'hydroxyde de sodium (le premier réactif de la méthode de Winkler). Les flacons dont le contenu en oxygène est fixé sous forme d'hydroxyde de manganèse (III) brun, sont conservés soigneusement fermés à l'obscurité, et à une température comprise entre 10 et 20 °C. Ne pas attendre plus de 24 heures avant de procéder aux étapes suivantes de la méthode de Winkler. Fermer les autres flacons préparés parallèlement en s'assurant qu'ils ne contiennent pas de bulles d'air et les incuber à 20 °C a l'obscurité. Chaque série doit être accompagnée d'une série complète d'essais à blanc ensemencés pour la détermination du témoin inoculum. Prélever régulièrement (au moins chaque semaine) deux flacons au moins dans chaque série, afin d'analyser l'oxygène dissous pendant la durée de l'incubation qui est de 28 jours.

Les prélèvements hebdomadaires d'échantillons permettent de déterminer le pourcentage de disparition dans un intervalle de 14 jours, alors que les prélèvements effectués tous les 3 ou 4 jours, qui nécessitent environ deux fois plus de flacons, permettent d'identifier l'intervalle de temps de 10 jours.

Si la substance à étudier contient de l'azote, il convient d'effectuer une correction pour tenir compte de la consommation d'oxygène due à la nitrification. Pour cela, déterminer la concentration d'oxygène dissous par la méthode de l'électrode à O_2 et, ensuite, analyser la teneur en nitrite et en nitrate sur un échantillon prélevé dans le flacon DBO. Calculer la quantité d'oxygène utilisée sur la base de l'augmentation de la concentration de nitrite et de nitrate (voir annexe V).

VI.3. RÉSULTATS ET RAPPORT

VI.3.1. **Traitement des résultats**

En premier lieu, calculer la DBO après chaque période de temps en soustrayant la perte en oxygène (mg O_2/l) dans l'essai à blanc contenant l'inoculum de celle que l'on observe avec la substance à étudier. Diviser cette perte en oxygène ainsi corrigée par la concentration (mg/l) de la substance à étudier. Le résultat obtenu correspond à la DBO spécifique exprimée en mg d'oxygène par mg de substance d'essai. Calculer le pourcentage de biodégradabilité en divisant la DBO spécifique par la DThO spécifique (calculée selon les indications données à l'annexe II.2) ou par la DCO (déterminée par analyse, voir annexe II.3).

Ainsi:

$$\text{DBO} = \frac{\text{mg } O_2 \text{ consommé par la substance à étudier} - \text{mg } O_2 \text{ consommé par le blanc}}{\text{mg de substance à étudier dans la fiole}}$$

▼B

= mg d'O_2 par mg de produit à étudier

$$\% \text{ de dégradation} = \frac{\text{DBO } (\text{mg } O_2/\text{mg de substance à étudier})}{\text{DThO}(\text{mg } O_2/\text{mg de substance à étudier})} \times 100$$

$$\% \text{ de dégradation} = \frac{\text{DBO } (\text{mg } O_2/\text{mg de substance à étudier})}{\text{DCO}(\text{mg } O_2/\text{mg de substance à étudier})} \times 100$$

Il faut noter que ces deux méthodes ne conduisant pas nécessairement au même résultat, il est préférable d'utiliser la première.

Dans le cas où la substance d'essai contient de l'azote, il convient d'utiliser la DThO appropriée (NH_4 ou NO_3) en fonction des connaissances ou des prévisions concernant l'éventualité de la nitrification (annexe II.2.). Si une nitrification a lieu sans toutefois être complète, corriger pour tenir compte de la consommation d'oxygène due à la nitrification à partir des modifications de la concentration de nitrite et de nitrate (annexe V).

VI.3.2. **Validité des résultats**

La perte d'oxygène dans l'essai à blanc contenant l'inoculum ne doit pas dépasser 1,5 mg/l d'oxygène dissous après 28 jours. Des valeurs supérieures nécessitent une vérification des méthodes expérimentales. La concentration résiduelle d'oxygène dans les flacons d'essai ne doit à aucun moment descendre au-dessous de 0,5 mg/l. Une teneur en oxygène aussi basse n'est acceptable que si la méthode utilisée pour mesurer l'oxygène dissous est capable de mesurer de telles concentrations avec précision.

Voir également I.5.2.

VI.3.3. **Rapport**

Voir 1.8.

VI.4. FICHE DE DONNÉES

Un exemple de fiche de données est présenté ci-dessous.

ESSAI EN FIOLES FERMÉES

1. **LABORATOIRE**

2. **DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI**

3. **SUBSTANCE À ÉTUDIER**

   Nom:

   Concentration de la solution mère: ... mg/l

   Concentration initiale dans la fiole: ... mg/l

   DThO/DCO: ... mg O_2/mg de produit à étudier

4. **INOCULUM**

   Origine: ...

   Traitement: ...

▼B

Préconditionnement éventuel: ...

Concentration dans le mélange réactionnel: ... mg/l

5. **DÉTERMINATION DE L'OD**

Méthode de Winkler ou de l'électrode.

Analyses des fioles

Temps d'incubation (d)			OD (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Blanc (sans produit)	1	C_1				
	2	C_2				
Moyenne	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Produit à étudier	1	a_1				
	2	a_2				
Moyenne	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Note: Des tableaux de ce type peuvent être utilisés pour le produit de référence et le témoin de toxicité.

6. **CORRECTION TENANT COMPTE DE LA NITRIFICATION** (annexe V)

Temps d'incubation (d)		0	n_1	n_2	n_3
(i)	Concentration de nitrate (mg N/l)				
(ii)	Modif. de la conc. de nitrate (mg N/l)	—			
(iii)	Équivalent oxygène (mg/l)	—			
(iv)	Concentration de nitrite (mg N/l)				
(v)	Modif. de la conc. de nitrite (mg N/l)	—			
(vi)	Équivalent oxygène (mg/l)	—			
(iii + vi)	Total équivalent oxygène (mg/l)	—			

7. **PERTE D'OD: % DE DÉGRADATION**

	Perte après n jours (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
FIOLE 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
FIOLE 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Perte après n jours (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
FIOLE 1: $\%D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{conc. produit à étudier} \times \text{DThO}}$				
FIOLE 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{conc. produit à étudier} \times \text{DThO}}$				
$\%$ D moyen (*) $= \frac{D_1 + D_2}{2}$				

(*) Ne pas utiliser la moyenne si tes résultats des essais en double varient considérablement.

m_{to} = valeur dans la fiole d'essai au temps 0

m_{tx} = valeur dans la fiole d'essai au temps x

m_{bo} = valeur moyenne du blanc au temps 0

m_{bx} = valeur moyenne du blanc au temps x

Appliquer également la correction tenant compte de la nitrification mentionnée aux points (iii) et (vi) du paragraphe 6.

8. **PERTE D'OD DANS L'ESSAI À BLANC**

Consommation d'oxygène dans l'essai à blanc: (m_{bo} — m_{b28}) mg/l. Cette consommation est importante pour la validité de l'essai. Elle doit être inférieure à 1,5 mg/l.

PARTIE VII. **ESSAI M.I.T.I.** (Méthode C.4-F)

VII.1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La consommation d'oxygène d'une solution ou d'une suspension agitée de substance à étudier dans un milieu minéral, ensemencée avec des micro-organismes cultivés à cet effet sans adaptation préalable, est établie à l'aide d'un respiromètre automatique en circuit fermé, à l'obscurité, pendant une période de 28 jours à 25 ± 1 °C. Le dioxyde de carbone dégagé est absorbé par de la chaux sodée. La biodégradabilité est exprimée par le pourcentage de la consommation d'oxygène (corrigé en fonction de la consommation dans l'essai à blanc) par rapport à la consommation théorique (DThO). Le pourcentage de biodégradabilité primaire est également calculé d'après les analyses chimiques spécifiques supplémentaires effectuées au début et à la fin de l'incubation et, éventuellement, à l'aide de l'analyse du COD.

VII.2. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

VII.2.1. **Appareillage**

a) appareil de mesure automatique de la DBO par électrolyse ou respiromètre normalement équipé de 6 fioles d'une contenance de 300 ml chacune et de récipients contenant l'absorbant de CO_2;

▼B

b) pièce thermostatée et/ou bain-marie à 25 °C (± 1 °C au maximum);

c) dispositif de filtration sur membrane (facultatif);

d) analyseur de carbone (facultatif).

VII.2.2. **Préparation du milieu minéral**

Préparer les solutions mères suivantes, à l'aide de réactifs de qualité analytique et d'eau (1.6.1.):

a) Dihydrogénophosphate de potassium, KH_2PO_4 8,50 g

Monohydrogénophosphate de potassium, K_2HPO_4 21,75 g

Monohydrogénophosphate de sodium dodécahydraté, $Na_2HPO_4.12\ H_2O$ 44,60 g

Chlorure d'ammonium, NH_4Cl 1,70 g

Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre

Le pH de la solution doit être égal à 7,2

b) Sulfate de magnésium heptahydraté, $MgSO_4\ 7\ H_2O$ 22,50 g

Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre

c) Chlorure de calcium, anhydre $CaCl_2$ 27,50 g

Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre

d) Chlorure de fer (III) hexahydraté, $FeCl_3.6\ H_2O$ 0,25 g

Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre

Prélever 3 ml de chacune des solutions a), b) c) et d) et compléter le volume à 1 litre.

VII.2.3. **Préparation de l'inoculum**

Recueillir des échantillons frais dans 10 emplacements au moins, principalement dans des zones où divers produits chimiques sont utilisés et rejetés dans l'environnement. Recueillir des échantillons d'un litre de boue, de sols superficiels, d'eau, etc., dans des sites tels que les stations d'épuration des eaux d'égout, les stations d'épuration industrielle, les rivières, les lacs et les mers et bien les mélanger. Après avoir enlevé les matières flottantes, laisser reposer le mélange, puis ajuster le pH du surnageant à 7 ± 1 au moyen d'hydroxyde de sodium ou d'acide phosphorique.

Utiliser un volume de surnageant filtré suffisant pour remplir un récipient de traitement des boues activées et aérer le liquide pendant environ 23 heures 30. Trente minutes après avoir interrompu l'aération, retirer environ un tiers du volume total du liquide surnageant et ajouter à la partie décantée un volume égal d'une solution (pH 7) contenant 0,1 % de chacun des produits suivants: glucose, peptone, monophosphate de potassium, puis aérer à nouveau le mélange. Répéter cette opération chaque jour. La réserve de boue doit être préparée selon les bonnes pratiques: l'effluent doit être clair, la température doit être maintenue à 25 ± 2 °C, son pH égal à 7 ± 1, la boue doit bien décanter, l'aération doit être suffisante pour que le mélange soit en permanence en aérobiose, des protozoaires doivent être présents et l'activité de la boue doit être testée à l'aide d'une substance de référence au moins tous les trois mois. Ne pas utiliser la boue comme inoculum avant au moins un mois après sa préparation ni après plus de quatre mois. Il convient donc d'effectuer périodiquement des prélèvements d'échantillons, tous les trois mois, en 10 emplacements différents au moins.

▼B

Afin de conserver la même activité aux boues fraîches et anciennes, le surnageant filtré d'une boue activée utilisée pour l'essai doit être mélangé en volume égal au surnageant filtré d'une boue fraîchement recueillie provenant de dix sources différentes. Le mélange ainsi obtenu est mis en culture comme décrit ci-avant. Prélever la boue pour l'utiliser comme inoculum 18 à 24 heures après cette opération.

VII.2.4. **Préparation des fioles**

Préparer les six fioles suivantes:

N° 1: eau de dilution contenant 100 mg/l de substance à étudier,

N°s 2, 3 et 4: milieu minéral contenant 100 mg/l de substance à étudier,

N° 5: milieu minéral contenant 100 mg/l de produit de référence (par exemple de l'aniline),

N° 6: milieu minéral seul.

Si la substance à étudier est peu soluble, il convient d'en ajouter directement un poids ou un volume défini, ou de procéder selon les instructions figurant à l'annexe III, en n'utilisant toutefois ni solvant ni émulsifiant. Placer l'absorbant de CO_2 pour chaque fiole, dans la coupelle spécialement prévue à cet effet. Ajuster à 7,0 le pH de la solution contenue dans les fioles n°s 2, 3 et 4.

VII.2.5. **Déroulement de l'essai**

Ensemencer les fioles n°s 2, 3 et 4 (suspensions d'essai), n° 5 (témoin d'activité) et n° 6 (blanc contenant l'inoculum) avec un petit volume d'inoculum de manière à ce que la concentration des matières solides en suspension soit égale à 30 mg/l. Ne pas ajouter d'inoculum dans la fiole n° 1 qui sert de témoin abiotique. Assembler le matériel, vérifier l'étanchéité à l'air, brancher les agitateurs et commencer à mesurer la consommation d'oxygène dans l'obscurité. Vérifier chaque jour la température et le fonctionnement des agitateurs et de l'enregistreur de l'appareil de mesure coulométrique de la consommation d'oxygène et noter toute modification de couleur du milieu contenu dans les fioles. Lire la consommation d'oxygène dans les six fioles directement avec une méthode appropriée, par exemple sur l'enregistreur à six points, qui fournit une courbe de la DBO. À la fin de l'incubation, dont la durée normale est de 28 jours, mesurer le pH du contenu des fioles et déterminer la concentration résiduelle de la substance à étudier et de toute substance intermédiaire et dans le cas d'une substance hydrosoluble, la concentration de COD (annexe II.4). Des précautions particulières doivent être prises pour étudier les produits volatiles. Si un processus de nitrification est prévisible, déterminer, si possible, la concentration en nitrates et nitrites.

VII.3. PRÉSENTATION DES DONNÉES

VII.3.1. **Traitement des résultats**

La quantité d'oxygène consommée (mg) par la substance d'essai après un temps donné, corrigée de façon à tenir compte de la quantité d'O_2 consommée dans l'essai à blanc contenant l'inoculum après la même période de temps, est divisée par le poids de substance à étudier utilisé pour l'essai. Le résultat ainsi obtenu correspond à la DBO exprimée en mg d'oxygène/mg de substance d'essai, c'est-à-dire:

$$\text{DBO} = \frac{\text{mg } O_2 \text{ consom. par la substance d'essai} - \text{mg } O_2 \text{ consom. par le blanc}}{\text{mg de substance d'essai dans la fiole}}$$

= mg d'O_2/mg de substance d'essai

▼B

Le pourcentage de biodégradation est alors obtenu à l'aide de la formule suivante:

$$\% \text{ de biodégradation} = \% \text{ DThO} = \frac{\text{DBO (mg } O_2/\text{mg produit)}}{\text{DThO (mg } O_2/\text{mg produit)}} \times 100$$

Pour les mélanges, calculer la DThO à partir de l'analyse élémentaire, comme pour un composé simple. Choisir la DThO appropriée ($DThO_{NH4}$ ou $DThO_{NO3}$) selon que la nitrification est absente ou complète (annexe II.2). Cependant, si la nitrification se produit mais sans toutefois être complète, il convient d'effectuer une correction correspondant à la quantité d'oxygène consommée par la nitrification à partir des modifications de la concentration en nitrites et en nitrates (annexe V).

Calculer le pourcentage de biodégradation primaire à partir de la perte de produit chimique spécifique (d'origine) (voir 1.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Si la mesure de la disparition physico-chimique révèle une perte de produit d'essai dans la fiole n° 1, il convient de le consigner et de calculer le pourcentage de biodégradation en utilisant la concentration de substance d'essai (S_b) dans la fiole au bout de 28 jours.

Si la concentration de COD est déterminée (facultatif), calculer le pourcentage de biodégradation ultime à l'aide de la formule suivante:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

décrite au paragraphe I.7.1. Si la mesure de la disparition physico-chimique révèle une perte de COD dans la fiole n° 1, il convient de calculer le pourcentage de dégradation en utilisant la concentration de COD dans cette fiole.

Consigner tous les résultats sur les fiches de données fournies.

VII.3.2. **Validité des résultats**

La consommation d'oxygène dans l'essai à blanc contenant l'inoculum est normalement comprise entre 20 et 30 mg O_2/l et ne doit pas excéder 60 mg/l en 28 jours. Des valeurs supérieures à 60 mg/l nécessitent un examen critique des données et des méthodes expérimentales. Si la valeur du pH se trouve en dehors de l'intervalle compris entre 6 et 8,5 et si la consommation d'oxygène par la substance d'essai est inférieure à 60 %, l'essai doit être répété avec une concentration plus faible de substance à étudier.

Voir également I.5.2.

Si le pourcentage de dégradation de l'aniline calculé à partir de la consommation d'oxygène ne dépasse pas 40 % après 7 jours et 65 % après 14 jours, l'essai est considéré comme non valable.

VII. 3.3. **Rapport**

Voir I.8.

VII.4. FICHE DE DONNÉES

Un exemple de fiche de données est présenté ci-dessous.

ESSAI MITI (I)

1. **LABORATOIRE**

2. **DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI**

▼B

3. **SUBSTANCE À ÉTUDIER**

Nom:

Concentration de la solution mère: ... mg/l de produit

Conc. initiale dans le milieu, C_o: ... mg/l de produit

Volume du mélange réactionnel, V: ... ml

DThO: ... mg O_2/l

4. **INOCULUM**

Emplacements d'échantillonnage des boues:

1) … 6) …

2) … 7) …

3) … 8) …

4) … 9) …

5) … 10) …

Concentration des matières en suspension dans la boue activée après acclimatation à l'aide d'une eau d'égout synthétique = mg/l

Volume de boue activée par litre de milieu final = ml

Concentration de boue dans le milieu final = mg/l

5. **CONSOMMATION D'OXYGÈNE: BIODÉGRADABILITÉ**

Type de respiromètre utilisé:

			Temps (jours)				
			0	7	14	21	28
Cons. d'O_2 (mg) du produit	a_1						
	a_2						
	a_3						
Cons. d'O_2 (mg) du blanc	b						
Cons. d'O_2 corrigée (mg)	$(a_1 - b)$ $(a_2 - b)$ $(a_3 - b)$						
DBO par mg de produit	$\frac{(a-b)}{C_o V}$	Fiole 1					
		Fiole 2					
		Fiole 3					
% dégradation $\frac{DBO}{DThO} \times 100$		1					
		2					
		3					
		moy (*)					

(*) Ne pas calculer la moyenne lorsque la différence entre les réplicats est trop grande.

▼B

Note: Des tableaux de ce type peuvent être utilisés pour le produit de référence et les témoins de toxicité.

6. **ANALYSE DE CARBONE** (facultative)

Analyseur de carbone: ...

Fiole	COD				% COD éliminé	Moy.
	Mesuré		Corrigé			
Eau + subst. d'essai	a				—	—
Boue + subst. d'essai	b_1		b_1 — c			
Boue + subst. d'essai	b_2		b_2 — c			
Boue + subst. d'essai	b_3		b_3 — c			
Essai à blanc	c		—		—	—

% COD éliminé : $\frac{a - (b - c)}{a} \times 100$

7. **DONNÉES DE L'ANALYSE SPÉCIFIQUE CHIMIQUE**

	Quantité résiduelle de produit à la fin de l'essai	% de dégradation
essai à blanc avec de l'eau	S_b	
milieu inoculé	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

% de dégradation $= \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

Calculer le % de dégradation pour les fioles a_1 a_2 et a_3 respectivement.

8. **OBSERVATIONS**

La courbe de la DBO en fonction du temps doit, le cas échéant, être jointe.

▼B

Annexe 1

ABRÉVIATIONS ET DÉFINITIONS

OD: oxygène dissous (mg/l), c'est-à-dire la concentration d'oxygène dissous dans un échantillon aqueux.

DBO: demande biochimique en oxygène (g), soit la quantité d'oxygène consommée par des micro-organismes au moment où ils métabolisent un produit soumis à l'essai; la DBO est également exprimée en g d'oxygène consommé par g de produit à étudier (voir la méthode C.5).

DCO: demande chimique d'oxygène (g), c'est-à-dire la quantité d'oxygène consommée au cours de l'oxydation d'un produit à étudier en présence de bichromate acide chaud; la DCO fournit une mesure de la quantité de matière oxydable présente; la DCO est également exprimée en g d'oxygène consommé par g de substance à étudier (voir méthode C.6).

COD: carbone organique dissous. Il s'agit du carbone organique présent dans une solution ou qui traverse un filtre d'une porosité de 0,45 micromètre ou encore qui reste dans le surnageant après une centrifugation de 15 min à 40 000 $m.s^{-2}$ (± 4 000 g).

DThO: demande théorique en oxygène (mg), c'est-à-dire la quantité totale d'oxygène nécessaire pour parvenir à l'oxydation complète d'un produit chimique. Elle est calculée à partir de la formule moléculaire (voir annexe II.2). La DThO est également exprimée en mg d'oxygène nécessaire par mg de produit à étudier.

CO_2Th: dioxyde de carbone théorique (mg). Il s'agit de la quantité calculée de dioxyde de carbone pouvant être produite à partir du contenu en carbone mesuré ou connu dans le produit à étudier, lors de sa minéralisation totale. Le CO_2Th est également exprimé en mg de dioxyde de carbone qui se dégage par mg de produit à étudier.

COT: carbone organique total. Le COT d'un échantillon est égal à la somme du carbone organique en solution et en suspension.

CI: carbone inorganique.

CT: carbone total. Le CT est égal à la somme du carbone organique et du carbone inorganique présents dans l'échantillon.

Biodégradation primaire:

Altération de la structure chimique d'une substance obtenue par une action biologique et entraînant la perte de propriétés spécifiques de cette substance.

Biodégradation ultime (en aérobiose):

Taux de dégradation atteint lorsque la totalité de la substance à étudier a été utilisée par des micro-organismes pour produire du dioxyde de carbone, de l'eau, des sels minéraux et de nouveaux constituants cellulaires microbiens (biomasse).

Facilement biodégradable:

Il s'agit d'un classement arbitraire des produits chimiques qui ont répondu positivement à des essais portant sur la biodégradabilité ultime; du fait de la rigueur de ces essais, on suppose que ces composés se dégradent rapidement et complètement en milieu aquatique dans des conditions d'aérobiose.

▼B

Intrinsèquement biodégradable:

Il s'agit d'une classification des produits chimiques donc la biodégradation (primaire ou ultime) a été prouvée sans ambiguïté au cours d'un essai de biodégradabilité reconnu internationalement.

Traitabilité:

Aptitude des composés à disparaître au cours du traitement biologique des eaux résiduaires sans effet indésirable sur le déroulement normal du traitement. D'une manière générale, les composés facilement biodégradables sont traitables, ce qui n'est pas le cas de tous les composés intrinsèquement biodégradables. Des processus abiotiques peuvent également se produire.

Phase de latence

correspond à la période qui, au cours d'un essai de disparition, sépare le moment de l'ensemencement de celui où le pourcentage de dégradation a augmenté d'au moins 10 %. La durée de la phase de latence est souvent extrêmement variable et peu reproductible.

Phase de dégradation

correspond à la période qui commence à la fin de la phase de latence et se termine au moment où 90 % du taux maximal de dégradation a été atteint.

Intervalle de 10 jours

Il s'agit des 10 jours immédiatement consécutifs au moment où le taux de dégradation atteint 10 %.

▼B

Annexe II

CALCUL ET DÉTERMINATION DE PARAMÈTRES APPROPRIÉS

Certains paramètres seront requis en fonction de la méthode choisie. Le chapitre suivant décrit le calcul de ces valeurs. L'utilisation de ces paramètres est décrite dans les chapitres consacrés à chaque méthode.

1. **Teneur en carbone**

La teneur en carbone est calculée à partir de la composition élémentaire connue de la substance à étudier, ou déterminée par l'analyse élémentaire de cette substance.

2. **Demande théorique en oxygène (DThO)**

La demande théorique en oxygène (DThO) peut être calculée si la composition élémentaire est connue ou déterminée par analyse élémentaire. Par exemple la DThO du composé suivant:

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

sera, en l'absence de nitrification, égale à:

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

et si une nitrification a lieu, elle sera égale à:

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Demande chimique en oxygène (DCO)**

La demande chimique en oxygène (DCO) est déterminée à l'aide de la méthode C.6.

4. **Carbone organique dissous (COD)**

Le carbone organique dissous (COD) est, par définition, le carbone organique présent dans la solution aqueuse d'un produit chimique ou d'un mélange, qui traverse un filtre d'une porosité de 0,45 micromètre.

Prélever des échantillons dans les récipients d'essai et les filtrer immédiatement à l'aide d'un dispositif de filtration en utilisant une membrane filtrante appropriée. Les 20 premiers ml de filtrat (la quantité peut être réduite si on utilise des filtres de petite taille) sont éliminés. Un volume de filtrat compris entre 10 et 20 ml, ou moins s'il doit être injecté (le volume dépend de la quantité requise pour l'analyseur de carbone), est retenu afin d'en analyser la teneur en carbone. La concentration en COD est déterminée à l'aide d'un analyseur de carbone organique capable de mesurer avec précision une concentration de carbone égale ou inférieure à 10 % de la concentration initiale de COD utilisée pour l'essai.

Les échantillons filtrés qui ne sont pas analysés le jour même peuvent être conservés pendant 48 heures dans un réfrigérateur entre 2 et 4 °C ou en-dessous de — 18 °C pour des périodes plus longues.

Remarque:

Les membranes filtrantes étant souvent imprégnées d'agents tensio-actifs pour l'hydrophilisation, sont susceptibles de contenir plusieurs milligrammes de carbone organique soluble qui interfèrent avec les déterminations de la biodégradabilité. Pour débarrasser les filtres des agents tensio-actifs ainsi que d'autres composés organiques solubles, il convient de les faire bouillir trois fois pendant une heure dans de l'eau déionisée. Ils peuvent ensuite être conservés dans de l'eau pendant une semaine. Si l'on utilise des cartouches filtrantes à usage unique, chaque lot doit être vérifié afin de s'assurer qu'il ne libère pas de carbone organique soluble.

▼B

La substance à étudier peut être retenue par adsorption sur certains types de membranes filtrantes. C'est pourquoi il est conseillé de s'assurer que le produit à étudier n'est pas retenu par le filtre.

Une centrifugation à 40 000 $m.sec^{-2}$ (4 000 g) pendant 15 minutes peut remplacer la filtration pour distinguer le COT du COD. Cette méthode n'est pas fiable si la concentration initiale en COD est inférieure à 10 mg/l, soit parce que toutes les bactéries ne sont pas éliminées, soit parce que du carbone faisant partie intégrante du plasma bactérien est redissous.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Publ. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, p 65.

(2) Wagner, R. Von Wasser, 1976, Vol. 46, 139.

(3) DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 — Deutsches Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

(4) Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13 (1), 169.

▼B

Annexe III

ÉVALUATION DE LA BIODÉGRADABILITÉ DES SUBSTANCES FAIBLEMENT SOLUBLES

Lors des essais de biodégradabilité concernant des substances faiblement solubles, il faut prêter une attention particulière aux éléments énoncés ci-après.

Alors que les liquides homogènes posent rarement des problèmes d'échantillonnage, il est recommandé d'homogénéiser les matières solides par des moyens appropriés afin d'éviter les erreurs dues au manque d'homogénéité. Il convient de prendre des précautions particulières pour prélever, dans des mélanges de produits chimiques ou dans des substances riches en impuretés, des échantillons de quelques milligrammes qui soient représentatifs.

Différents types d'agitation peuvent être utilisés au cours de l'essai, mais il faut veiller à ce que l'agitation soit juste suffisante pour maintenir la dispersion du produit tout en évitant une surchauffe, la formation excessive de mousse ou des forces de cisaillement excessives.

Il est possible d'utiliser un émulsifiant qui produise une dispersion stable du produit. Il ne devra ni être toxique pour les bactéries, ni être biodégradé, ni former de la mousse dans les conditions d'essai.

Les mêmes critères s'appliquent aux solvants et aux émulsifiants.

Il n'est pas conseillé d'utiliser des supports solides pour les produits solides; leur utilisation peut, par contre, être appropriée dans le cas des substances huileuses.

Lorsqu'une substance auxiliaire, telle qu'un émulsifiant, un solvant ou un support, est utilisée, il convient d'effectuer un essai à blanc avec cette substance.

Les trois essais de respirométrie, CO_2, DBO ou MITI, conviennent pour étudier la biodégradabilité des composés faiblement solubles.

BIBLIOGRAPHIE

— de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 833.

— Gerike, P. The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13, 169.

▼B

Annexe IV

ÉVALUATION DE LA BIODÉGRADABILITÉ DES PRODUITS CHIMIQUES SUSPECTÉS DE TOXICITÉ VIS-À-VIS DE L'INOCULUM

Lorsqu'un produit est soumis à des essais de biodégradabilité facile et semble ne pas être biodégradable, il est recommandé de suivre la procédure suivante si l'on souhaite effectuer une distinction entre inhibition et inertie (Reynolds et al., 1987).

Il convient de procéder aux essais de toxicité et de biodégradation avec des inoculums semblables ou identiques.

Pour évaluer la toxicité des produits soumis aux essais de biodégradabilité facile, il semble approprié d'appliquer soit l'une des méthodes suivantes soit une combinaison de ces méthodes: inhibition du taux de respiration de la boue (essai d'inhibition de la respiration des boues activées — directive 88/302/CEE), DBO, et/ou inhibition de la croissance.

S'il convient d'éviter l'inhibition due à la toxicité, il est suggéré d'utiliser pour les essais de biodégradabilité facile des concentrations de la substance d'essai inférieures au 1/10 de la valeur de la CE_{50} obtenue lors des essais de toxicité (ou inférieures à la valeur de la CE_{20}). Il est peu vraisemblable que les composés dont la CE_{50} a une valeur supérieure à 300 mg/l produisent un effet toxique lors des tests de biodégradabilité facile. Il est vraisemblable que des valeurs de CE_{50} inférieures à 20 mg/l poseront de sérieux problèmes lors des essais ultérieurs. Il convient dans ce cas d'employer de faibles concentrations d'essai nécessitant l'utilisation de l'essai en fioles fermées, qui est rigoureux et sensible, ou de produit marqué au ^{14}C. Une autre manière de procéder consiste à utiliser un inoculum acclimaté permettant d'utiliser des concentrations plus élevées de substance d'essai. Toutefois, dans ce cas, on perd le critère spécifique de l'essai de biodégradation facile.

BIBLIOGRAPHIE

Reynolds, L. et al. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol. 16,2259.

▼B

Annexe V

CORRECTION TENANT COMPTE DE LA CONSOMMATION D'OXYGÈNE DUE À L'INTERFÉRENCE DE LA NITRIFICATION

Les erreurs commises en ne tenant pas compte de la nitrification lors de la détermination de la biodégradabilité par mesure de la consommation d'oxygène sont mineures (inférieures a 5 %) lorsque les substances à étudier ne contiennent pas d'azote, même si l'oxydation de l'azote ammoniacal dans le milieu se produit occasionnellement dans les récipients d'essai ainsi que dans les essais à blanc. Par contre, des erreurs importantes peuvent se produire avec les substances qui contiennent de l'azote.

Si la nitrification se produit, mais n'est pas complète, la consommation d'oxygène observée dans le mélange réactionnel peut être corrigée d'une valeur correspondant à la quantité d'oxygène utilisée pour oxyder l'ammonium en nitrite et en nitrate, si les modifications de la concentration de nitrite et de nitrate au cours de l'incubation sont déterminées par les équations suivantes:

$$2\ NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Au total:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

D'après l'équation (1), la quantité d'oxygène consommée par l'oxydation de 28 g d'azote contenus dans du chlorure d'ammonium (NH_4Cl) pour former des nitrites est égale à 96 g, ce qui correspond à un facteur 3,43 (96/28). De même, d'après l'équation (3), la quantité d'oxygène consommée par l'oxydation de 28 g d'azote pour former des nitrates est de 128 g, ce qui correspond à un facteur 4,57 (128/28).

Les réactions étant séquentielles et effectuées par différentes espèces bactériennes distinctes, la concentration en nitrite peut augmenter ou diminuer; dans ce dernier cas, la concentration de nitrate est équivalente. La quantité d'oxygène consommée par la formation de nitrate est donc égale a 4,57 multiplié par l'augmentation de la concentration de nitrate, alors que la quantité d'oxygène associée à la formation de nitrite est égale à 3,43 multiplié par l'augmentation de la concentration en nitrite ou dans le cas d'une réduction de sa teneur, la perte en oxygène est égale à - 3,43 multiplié par la diminution de concentration.

Ainsi:

O_2 consommé par la formation de nitrate = 4,57 × augmentation de la concentration de N-nitrate (4),

.

O_2 consommé par la formation de nitrite = 3,43 × augmentation de la concentration de N-nitrite (5)

et donc

O_2 perdu lors de la disparition de nitrite = - 3,43 × réduction de la concentration de N-nitrite (6)

De telle sorte que:

la consommation d'O_2 due à la nitrification = ± 3,43 × modif. de la conc. de N-nitrite + 4,57 × augm. de la conc. de N-nitrate (7)

et donc:

la consommation d'O_2 due à l'oxydation du C = consommation totale observée — consommation due à la nitrification (8).

Une autre possibilité consiste à estimer que, si seul l'azote oxydé total est déterminé, la consommation d'oxygène due à la nitrification sera, en première approximation, égale à 4,57 × l'augmentation de la teneur en azote oxydé.

La valeur corrigée de la consommation d'oxygène due à l'oxydation du C est ensuite comparée à la $DThO_{NH3}$ calculée selon les instructions figurant à l'annexe II.

▼B

C.5. DÉGRADATION — DEMANDE BIOCHIMIQUE EN OXYGÈNE

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

La méthode a pour objet la mesure de la demande biochimique en oxygène (DBO) de substances organiques, liquides ou solides.

Les données fournies par cet essai concernent les composés hydrosolubles; toutefois, les composes volatils et les composés à faible hydrosolubilité peuvent également être étudiés, du moins en principe.

La méthode est applicable uniquement aux substances organiques, non inhibitrices vis-à-vis des bactéries à la concentration utilisée au cours de l'essai. Si la substance d'essai n'est pas soluble à la concentration d'essai, des procédures particulières telles que le recours à la dispersion ultrasonique pourraient être utilisées, afin d'obtenir une bonne dispersion de la substance.

Des données sur la toxicité de la substance chimique peuvent être utiles pour l'interprétation de résultats faibles et pour le choix de concentrations d'essai appropriées.

1.2. DÉFINITION ET UNITÉS

La DBO est définie comme la masse d'oxygène dissoute nécessaire pour assurer, dans des conditions définies, l'oxydation biochimique d'un volume défini d'une solution de la substance soumise aux essais.

Les résultats sont exprimés en grammes de DBO par gramme de substance soumise à l'essai.

1.3. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Il est souhaitable de vérifier l'activité de l'inoculum à l'aide d'une substance de référence appropriée.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Ensemencer avec des micro-organismes et incuber à une température ambiante constante, définie, dans l'obscurité, une quantité prédéterminée de substance, dissoute ou dispersée en milieu aéré approprié.

La DBO est déterminée par la différence entre la teneur en oxygène dissous au début et à la fin de l'essai. La durée de l'essai est d'au moins cinq jours et ne dépassera pas 28 jours.

Un blanc doit être déterminé dans un essai parallèle ne contenant pas de substance d'essai.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

La détermination de la DBO ne peut être considérée comme représentant valablement la biodégradabilité d'une substance et ne constitue qu'un essai de sélection.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparer une solution ou une dispersion préliminaire de la substance, afin d'obtenir une concentration de DBO compatible avec la méthode utilisée. La DBO est alors déterminée par application de toute méthode appropriée, normalisée, nationale ou internationale.

▼B

2. **ÉVALUATION DES DONNÉES**

La DBO contenue dans la solution préliminaire est calculée suivant la méthode normalisée choisie et convertie en grammes de DBO par gramme de substance d'essai.

3. **RÉSULTATS**

La méthode utilisée doit être indiquée.

La demande biochimique en oxygène doit être la moyenne d'au moins trois mesures valables.

Toutes les données et observations pertinentes aidant à l'interprétation des résultats doivent être consignées, notamment en ce qui concerne les impuretés, l'état physique, les effets toxiques et la composition intrinsèque de la substance susceptibles d'affecter les résultats.

L'utilisation de tout additif inhibiteur de la nitrification biologique doit être consignée.

4. RÉFÉRENCES

Exemples de méthodes normalisées:

NF T 90-103: Détermination de la demande biochimique en oxygène.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van net biochemish zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

C.6. DÉGRADATION — DEMANDE CHIMIQUE EN OXYGÈNE

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

La méthode a pour objet la mesure de la demande chimique en oxygène (DCO) de substances organiques, liquides ou solides, par application de tout mode opératoire normalisé, dans des conditions de laboratoire déterminées.

Le fait de disposer de données sur la formule de la substance facilitera la réalisation de cet essai ainsi que l'interprétation des résultats obtenus (par exemple, sels halogénés, sels ferreux de composés organiques, composés organochlorés).

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

La demande chimique en oxygène est la mesure de l'oxydabilité d'une substance, définie comme la quantité d'oxygène d'un réactif oxydant, consommée par la substance dans des conditions de laboratoire déterminées.

Le résultat est exprimé en grammes de DCO par gramme de substance d'essai.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

L'emploi de substances de référence n'est pas requis dans tous les cas où l'on analyse une nouvelle substance. Ces substances de référence doivent permettre d'étalonner périodiquement la méthode et de permettre la comparaison des résultats en cas d'application de méthodes différentes.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Une quantité déterminée de substance dissoute ou dispersée dans de l'eau est oxydée à l'aide de bichromate de potassium en présence d'acide sulfurique concentré (le catalyseur étant du sulfate d'argent) à reflux pendant deux heures. Le bichromate résiduel est dosé par titration à l'aide de sulfate ferreux ammoniacal titré.

Au cas où les substances contiennent du chlore, ajouter du sulfate mercurique ([1]) pour réduire l'interférence des chlorures.

1.5. CRITÈRE DE QUALITÉ

En raison des conditions arbitraires de détermination de la DCO, cette dernière est un «indicateur d'oxydabilité» à utiliser en tant que tel comme méthode pratique de mesure de matière organique.

Les chlorures peuvent interférer au cours de cet essai; des substances inorganiques réductrices ou oxydantes peuvent également interférer avec la détermination de la DCO.

Certains composés cycliques et un grand nombre de produits volatils (par exemple les acides gras inférieurs) ne sont pas totalement oxydés lors de l'essai.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparer une solution ou une dispersion préliminaire de la substance pour obtenir une DCO de 250 à 600 milligrammes par litre.

([1]) Afin d'éviter la dissémination de mercure dans l'environnement, les solutions contenant des sels de mercure doivent être traitées après utilisation.

▼B

Remarque:

Dans le cas des substances peu solubles et non dispersables, peser une quantité de substance finement pulvérisée ou à l'état liquide, correspondant à environ 5 milligrammes de DCO, et l'introduire dans l'appareil d'expérimentation avec addition d'eau.

Il est souvent avantageux, en particulier lorsqu'on a affaire à des substances peu solubles, de déterminer la demande chimique en oxygène (DCO) à l'aide d'une variante de la méthode, c'est-à-dire dans un système clos muni d'un régulateur de pression (H. Kelkenberg, 1975). Cette modification permet souvent de parvenir à quantifier des substances qui le sont difficilement en utilisant la méthode classique — par exemple l'acide acétique. Toutefois cette méthode échoue elle aussi dans le cas de la pyridine. Le fait d'augmenter jusqu'à une valeur 0,25 N (0,0416 M) la concentration de bichromate de potassium prescrite dans la référence (1) facilite la pesée directe d'une quantité de substance comprise entre 5 et 10 mg, ce qui est essentiel pour déterminer la DCO de substances faiblement hydrosolubles [référence (2)].

Dans les autres cas, déterminer la DCO en suivant toute méthode normalisée nationale ou internationale.

2. **ÉVALUATION DES DONNÉES**

Calculer la DCO contenue dans le flacon expérimental, suivant la méthode normalisée choisie, et convertir en grammes de DCO par gramme de substance d'essai.

3. **RÉSULTATS**

La méthode de référence utilisée doit être indiquée.

La demande chimique en oxygène sera la moyenne d'au moins trois mesures. Il sera fait état de toutes données et observations présentant de l'intérêt pour l'interprétation des résultats, notamment en ce qui concerne les impuretés, l'état physique et les propriétés spécifiques de la substance (si elles sont connues) susceptibles d'affecter les résultats.

Mentionner si l'on a fait usage de sulfate mercurique pour réduire l'interférence des chlorures.

4. **RÉFÉRENCES**

(1) Kelkenberg, H.,Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

(2) Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds, Chemosphere, 1984, vol. 13,169.

Exemples de méthodes normalisées:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

C.7. DÉGRADATION — DÉGRADATION ABIOTIQUE: HYDROLYSE EN FONCTION DU PH

1. MÉTHODE

Cette méthode est équivalente à la ligne directrice 111 (2004) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

Les substances chimiques qui pénètrent dans les eaux de surface par différentes voies (applications directes, déperditions lors de l'épandage, drainages, élimination de déchets, effluents industriels, domestiques ou agricoles et dépôts atmosphériques) peuvent y être transformées sous l'action de processus chimiques (hydrolyse ou oxydation, par exemple), photochimiques et/ou microbiens. La ligne directrice 111 de l'OCDE décrit une méthode d'essai en laboratoire permettant d'évaluer les transformations hydrolytiques abiotiques des substances chimiques en milieux aquatiques à des valeurs de pH normalement rencontrées dans l'environnement (pH de 4 à 9), et s'appuie sur des lignes directrices existantes (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Des expériences sont menées pour déterminer: (i) le taux d'hydrolyse de la substance d'essai en fonction du pH; et (ii) l'identité ou la nature et les taux de formation et de disparition des produits d'hydrolyse auxquels les organismes peuvent être exposés. De telles études peuvent être requises pour les substances chimiques qui sont appliquées directement dans l'eau ou qui sont susceptibles d'atteindre l'environnement par les différentes voies décrites ci-dessus.

1.2. DÉFINITION ET UNITÉS

Voir annexe 2.

1.3. APPLICABILITÉ DE LA MÉTHODE

Cette méthode est globalement applicable aux substances chimiques (marquées ou non) pour lesquelles il existe une méthode analytique suffisamment sensible et précise. Elle convient également pour les composés légèrement volatils et non volatils suffisamment solubles dans l'eau. En revanche, cet essai ne peut pas être appliqué aux produits chimiques hautement volatils dans l'eau (fumigants et solvants organiques, par exemple), impossibles à maintenir en solution dans les conditions expérimentales de l'essai. De même, avec les substances trop peu solubles dans l'eau, la réalisation de cet essai peut s'avérer difficile (8).

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Des solutions aqueuses tampon stériles de différents pH (pH 4, 7 et 9) sont traitées avec la substance d'essai et incubées dans l'obscurité dans des conditions expérimentales contrôlées (à des températures constantes). Après des intervalles de temps appropriés, on analyse les solutions tampon pour déterminer la présence de la substance d'essai et des produits d'hydrolyse. Avec une substance d'essai marquée (par exemple, au ^{14}C), il est plus facile d'établir un bilan massique.

La présente méthode décrit une approche à plusieurs niveaux, dont le détail est donné dans l'annexe 1. Chaque niveau est déclenché par les résultats du niveau précédent.

▼B

1.5. INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

Des substances d'essai marquées ou non peuvent être utilisées pour mesurer le taux d'hydrolyse. Les matières marquées conviennent généralement mieux pour étudier le chemin réactionnel de l'hydrolyse et établir un bilan massique. Toutefois, dans certains cas particuliers, le marquage n'est pas impératif. Le marquage au ^{14}C est recommandé, mais l'utilisation d'autres isotopes (^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, par exemple) peut aussi convenir. Autant que possible, le marquage doit être placé dans la partie la plus stable de la molécule. Par exemple, si la substance d'essai comporte un cycle, le marquage de celui-ci est requis. En revanche, pour les substances comportant deux cycles ou plus, il peut être nécessaire de procéder à des études distinctes pour évaluer le sort de chaque cycle marqué et obtenir les informations requises sur la formation des produits d'hydrolyse. La pureté de la substance d'essai doit être au moins de 95 %.

Avant de procéder à un essai d'hydrolyse, il convient de rassembler les informations suivantes sur la substance d'essai:

a) solubilité dans l'eau [méthode d'essai A.6];

b) solubilité dans les solvants organiques;

c) pression de vapeur [Méthode d'essai A.4] et/ou constante de la loi de Henry;

d) coefficient de partage n-octanol/eau [méthode d'essai A.8];

e) constante de dissociation (pK_a) [ligne directrice 112 de l'OCDE] (9);

f) vitesse de phototransformation directe et indirecte dans l'eau, le cas échéant.

Des méthodes d'analyse doivent être disponibles pour quantifier la substance d'essai et, le cas échéant, identifier et quantifier les produits d'hydrolyse dans les solutions aqueuses (voir également le point 1.7.2).

1.6. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Lorsque cela est possible, il convient d'utiliser des substances de référence pour identifier et quantifier les produits d'hydrolyse par analyse spectroscopique et chromatographique, ou autres méthodes suffisamment fines.

1.7. CRITÈRES DE QUALITÉ

1.7.1. **Récupération**

L'analyse d'au moins deux solutions tampon ou de leurs extraits, immédiatement après l'ajout de la substance d'essai donne une première indication de la répétabilité de la méthode analytique et de l'uniformité de la procédure d'application de la substance d'essai. Ce sont les bilans massiques (dans le cas d'une matière marquée) qui permettent ensuite d'établir aux étapes suivantes la récupération des substances testées. La récupération des substances chimiques, marquées ou non, doit être comprise entre 90 et 110 % (7). S'il est techniquement difficile d'atteindre cette plage de valeurs, une récupération de 70 % des substances chimiques non marquées est acceptable, mais celle-ci doit faire l'objet d'une justification.

▼B

1.7.2. **Répétabilité et sensibilité de la méthode analytique**

Pour contrôler la répétabilité de la (ou des) méthode(s) analytique(s) utilisée(s) pour quantifier la substance d'essai et les produits d'hydrolyse, on peut procéder à deux analyses des mêmes solutions tampon (ou de leurs extraits) après que des produits d'hydrolyse ont été formés en quantités suffisantes pour permettre une quantification.

La méthode analytique doit être suffisamment sensible pour permettre de quantifier des concentrations de la substance d'essai jusqu'à 10 %, ou moins, de la concentration initiale. Le cas échéant, les méthodes analytiques doivent également permettre de quantifier tout produit d'hydrolyse représentant 10 % ou plus de la substance appliquée (à n'importe quel moment au cours de l'étude), et jusqu'à 25 % ou moins de sa concentration maximale.

1.7.3. **Intervalles de confiance pour les données cinétiques de l'hydrolyse**

Des intervalles de confiance doivent être calculés et présentés pour tous les coefficients de régression, constantes de vitesse, demi-vies et autres paramètres cinétiques (DT_{50}, par exemple).

1.8. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.8.1. **Matériel et appareillage**

L'étude doit être conduite dans des récipients en verre (tubes à essai, petits flacons, par exemple), et le cas échéant dans l'obscurité et dans des conditions de stérilité, sauf s'il ressort d'une information préliminaire (telle que le coefficient de partage n-octanol/eau) que la substance d'essai est susceptible d'adhérer au verre. Dans ce cas, une autre matière (le Téflon, par exemple) doit être envisagée. Les méthodes suivantes permettent également de contourner le problème de l'adhérence au verre:

— détermination de la masse de la substance d'essai et des produits d'hydrolyse fixés par adsorption au récipient d'essai,

— utilisation d'un bain à ultrasons,

— nettoyage de toute la verrerie à l'aide d'un solvant à chaque intervalle d'échantillonnage,

— utilisation de produits formulés,

— utilisation d'une quantité plus importante de cosolvant à ajouter à la substance d'essai. Dans ce dernier cas, il convient d'employer un cosolvant qui n'entraîne pas de réaction d'hydrolyse de la substance d'essai.

L'incubation des différentes solutions d'essai doit être effectuée avec des agitateurs mécaniques à bain thermorégulé ou des incubateurs à commande thermostatique.

Cette expérience nécessite du matériel courant de laboratoire, et en particulier:

— un pH-mètre,

▼B

— des instruments d'analyse [équipements de chromatographie en phase gazeuse, chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), chromatographie en couche mince, par exemple], et notamment des systèmes de détection appropriés pour l'analyse des substances radiomarquées ou non, l'application de la méthode de dilution isotopique inverse,

— des instruments d'identification (spectrométrie de masse, spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse, spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide à haute performance, résonance magnétique nucléaire, etc.),

— un compteur à scintillation liquide;

— des entonnoirs d'extraction liquide-liquide,

— des instruments pour la concentration de solutions et d'extraits (évaporateur rotatif, par exemple),

— des dispositifs de contrôle de la température (bain d'eau, par exemple).

Les réactifs chimiques sont notamment:

— des solvants organiques, de pureté analytique, tels que l'hexane, le dichlorométhane, etc.,

— du liquide de scintillation,

— des solutions tampon (voir détails point 1.8.3).

Toute la verrerie, l'eau de qualité «réactif» et les solutions tampon utilisées dans les essais d'hydrolyse doivent être stérilisées.

1.8.2. **Application de la substance d'essai**

La substance d'essai doit être appliquée sous forme de solution aqueuse dans les différentes solutions tampon (voir annexe 3). Le cas échéant, pour obtenir une dissolution adéquate, l'utilisation de petites quantités de solvants miscibles dans l'eau (acétonitrile, acétone, éthanol, par exemple) est autorisée pour assurer une application et une distribution correctes de la substance d'essai, mais la proportion ne doit normalement pas dépasser 1 % v/v. Si une concentration supérieure en solvants est envisagée (par exemple dans le cas de substances d'essai faiblement solubles), cela ne peut être autorisé que s'il est démontré que le solvant n'a aucune incidence sur l'hydrolyse de la substance d'essai.

Le recours à un produit formulé n'est pas recommandé, dans la mesure où on ne peut exclure que les ingrédients de la formulation interfèrent avec le processus d'hydrolyse. Toutefois, pour les substances d'essai faiblement solubles dans l'eau, ou celles qui adhèrent au verre (voir point 1.8.1), le recours à un produit formulé peut constituer une solution acceptable.

Une seule concentration de la substance d'essai doit être utilisée; elle ne doit pas dépasser 0,01 M ou la moitié de la concentration de saturation (voir annexe 1).

▼B

1.8.3. **Solutions tampon**

L'essai d'hydrolyse doit être réalisé aux valeurs de pH suivantes: 4, 7 et 9. À cet effet, il convient de préparer des solutions tampon avec des produits chimiques de pureté analytique et de l'eau. L'annexe 3 présente quelques systèmes tampon utiles. Il faut noter que le système tampon utilisé peut influencer la vitesse d'hydrolyse. Lorsque c'est le cas, il faut utiliser un autre système tampon ([1]).

Le pH de chaque solution tampon doit être vérifié avec un pH-mètre étalonné à la température désirée avec une précision d'au moins 0,1.

1.8.4. **Conditions d'essai**

1.8.4.1. *Température d'essai*

Les expériences d'hydrolyse doivent être menées à des températures constantes. Pour permettre l'extrapolation, il est important de maintenir la température constante à ± 0,5 °C.

Si on ne connaît pas le comportement de la substance d'essai à l'hydrolyse, il est nécessaire d'effectuer un essai préliminaire (niveau 1) à une température de 50 °C. Les essais cinétiques suivants doivent être menés à un minimum de trois températures différentes (y compris l'essai à 50 °C), à moins que l'essai préliminaire de niveau 1 n'ait mis en évidence la stabilité de la substance à l'hydrolyse. Une plage de températures allant de 10 à 70 °C est préconisée (avec de préférence au moins une température inférieure à 25 °C). Cette plage englobe la température utilisée dans le rapport d'essai (25 °C) et la plupart des températures rencontrées sur le terrain.

1.8.4.2. *Lumière et oxygène*

Tous les essais d'hydrolyse doivent être effectués à l'aide d'une méthode adéquate pour éviter les effets de photolyse. Toutes les mesures appropriées doivent être prises afin d'éviter l'oxygène (par exemple, par barbotage d'hélium, d'azote ou d'argon pendant 5 minutes avant la préparation de la solution).

1.8.4.3. *Durée de l'essai*

L'essai préliminaire doit être mené pendant 5 jours, tandis que les essais des niveaux supérieurs doivent être conduits jusqu'à 90 % de la substance d'essai, ou pendant 30 jours, au premier des deux termes échus.

1.8.5. **Exécution de l'essai**

1.8.5.1. *Essai préliminaire (niveau 1)*

L'essai préliminaire doit être réalisé à 50 ± 0,5 °C et aux pH suivants: 4, 7 et 9. Si au bout de 5 jours, on observe un taux d'hydrolyse inférieur à 10 % ($t_{0,5\ 25\ °C}$ > 1 an), la substance est considérée comme stable dans l'eau et il n'est normalement pas nécessaire d'effectuer d'autres essais. Si on sait que la substance est instable aux températures observées dans l'environnement ([2]), il n'est pas obligatoire de réaliser un essai préliminaire. La méthode analytique employée doit être suffisamment précise et sensible pour détecter une diminution de 10 % de la concentration initiale.

([1]) Mabey et Mill recommandent l'utilisation de tampons borate ou acétate de préférence à des tampons phosphate (11).

([2]) Cette information peut provenir d'autres sources, notamment des résultats d'hydrolyse de composés de structure comparable fournis par la littérature ou par d'autres essais d'hydrolyse préliminaires ou semi-quantitatifs effectués sur la substance d'essai à une étape plus précoce de son développement.

▼B

1.8.5.2. *Hydrolyse des substances instables (niveau 2)*

L'essai de niveau supérieur (avancé) doit être exécuté aux valeurs de pH auxquelles la substance d'essai est apparue instable selon la procédure définie pour l'essai préliminaire ci-avant. Les solutions tamponnées de la substance d'essai doivent alors être thermostatées aux températures choisies. Pour savoir si la réaction est du premier ordre, chaque solution doit être analysée à des intervalles de temps qui fournissent un minimum de six points espacés, se situant normalement entre 10 et 90 % d'hydrolyse de la substance étudiée. Des échantillons répétés (un minimum de deux échantillons identiques contenus dans des cuves de réaction distinctes) doivent être prélevés et leur contenu analysé à chacune des six échéances d'échantillonnage (pour un minimum de 12 points identiques). L'option consistant à utiliser un seul échantillon global d'où serait tirée chacune des aliquotes de la solution d'essai à chaque intervalle d'échantillonnage n'est pas considérée comme appropriée du fait qu'elle ne permet pas d'analyser la variabilité des données, et qu'elle peut poser des problèmes de contamination de la solution d'essai. Des essais de confirmation de la stérilité doivent être effectués à la fin de l'essai de niveau supérieur (c'est-à-dire à 90 % d'hydrolyse ou à 30 jours). Toutefois, si aucune dégradation (c'est-à-dire aucune transformation) n'est observée, les essais de stérilité ne sont pas nécessaires.

1.8.5.3. *Identification des produits d'hydrolyse (niveau 3)*

Tout produit d'hydrolyse majeur, et au minimum ceux représentant > 10 % de la dose appliquée, doit être identifié selon les méthodes analytiques appropriées.

1.8.5.4. *Essais facultatifs*

Des essais supplémentaires à des pH autres que 4, 7 et 9 peuvent être nécessaires pour les substances d'essai instables sur le plan hydrolytique. Par exemple, à des fins physiologiques, il peut s'avérer nécessaire d'effectuer un essai dans des conditions plus acides (par exemple à un pH de 1,2) à une seule température pertinente du point de vue physiologique (37 °C).

2. **RÉSULTATS**

Les quantités de la substance d'essai et des produits d'hydrolyse, le cas échéant, doivent être exprimées en pourcentage de la concentration initiale appliquée et, lorsque cela est possible, en mg/l pour chaque intervalle d'échantillonnage, ainsi que pour chaque pH et température d'essai. En outre, lorsqu'une substance d'essai marquée a été utilisée, un bilan massique doit être fourni en pourcentage de la concentration initiale appliquée.

Une présentation graphique des logarithmes des concentrations de la substance d'essai en fonction du temps doit être présentée. Tous les produits d'hydrolyse majeurs, et au minimum ceux représentant > 10 % de la dose appliquée, doivent être identifiés, et les logarithmes de leurs concentrations doivent être présentés de la même manière que pour la substance mère, de façon à mettre en évidence leurs vitesses de formation et de disparition.

▼B

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Des déterminations plus précises des demi-vies ou des valeurs de DT_{50} doivent être obtenues par application des calculs de modèles cinétiques appropriés. Les valeurs de demi-vie et/ou de DT_{50} (y compris les limites de confiance) doivent être précisées pour chaque pH et chaque température, avec une description du modèle utilisé, l'ordre de réaction cinétique et le coefficient de détermination (r^2). Le cas échéant, ces calculs doivent être appliqués aux produits d'hydrolyse.

Pour les études menées à différentes températures, les constantes de la vitesse d'hydrolyse de pseudo-premier ordre (k_{obs}) doivent être décrites comme une fonction de température. Le calcul doit être basé sur une séparation des k_{obs} en constantes de vitesse pour les catalyses acides, neutres et basiques (respectivement k_H, k_{neutre}, et k_{OH}) et sur l'équation d'Arrhenius:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutre} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutre,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

où A_i et B_i sont des constantes de régression et d'interception, respectivement, des lignes de meilleur ajustement générées à partir de la régression linéaire ln k_i sur la réciproque de la température absolue en Kelvin (T). En utilisant la relation d'Arrhenius pour les catalyses acides, neutres et basiques, il est possible de calculer les constantes de pseudo-premier ordre, et ainsi les demi-vies, pour d'autres températures pour lesquelles la détermination expérimentale directe d'une constante de vitesse ne peut être pratiquée (10).

2.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATIONS DES RÉSULTATS

La plupart des réactions d'hydrolyse affichent une vitesse de réaction apparente de premier ordre, et par conséquent les demi-vies sont indépendantes de la concentration (voir l'équation 4 dans l'annexe 2). Cette caractéristique permet généralement d'appliquer les résultats obtenus en laboratoire, déterminés entre 10^{-2} et 10^{-3} M, aux conditions dans l'environnement ($\leq 10^{-6}$ M) (10). Mabey et Mill (11) font état de plusieurs exemples de bonne concordance entre les taux d'hydrolyse mesurés dans l'eau pure et dans les eaux naturelles, pour un ensemble de substances chimiques, à condition que le pH et la température aient bien été mesurés.

3. **RAPPORTS**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir au moins les informations suivantes:

Substance d'essai:

— nom commun, nom chimique, numéro CAS, formule structurale (montrant la position du radiomarqueur, le cas échéant) et propriétés physico-chimiques pertinentes (voir point 1.5),

— pureté (impuretés) de la substance d'essai,

— pureté radiochimique des substances marquées et activité molaire (s'il y a lieu).

▼B

— Solutions tampon:

— dates et modalités de préparation,

— tampons et eaux utilisés,

— molarité et pH des solutions tampon.

Conditions d'essai:

— dates de réalisation des études,

— quantité de substance d'essai appliquée,

— méthodes et solvants utilisés (types et quantité) pour l'application de la substance d'essai,

— volume des solutions tamponnées de substances d'essai incubées,

— description du système d'incubation utilisé,

— pH et température au cours de l'étude,

— temps de prélèvement,

— méthode(s) d'extraction,

— méthodes de quantification et d'identification de la substance d'essai et de ses produits d'hydrolyse dans les solutions tampon,

— nombre d'essais identiques.

Résultats:

— répétabilité et sensibilité des méthodes analytiques utilisées,

— récupérations (les pourcentages pour une étude correcte sont données au point 1.7.1),

— résultats et moyennes des essais identiques, présentés sous forme de tableaux,

— bilan massique au cours et à la fin des études (en cas d'utilisation d'une substance marquée),

— résultats de l'essai préliminaire,

— discussion et interprétation des résultats,

— intégralité des données et figures originales.

Les informations suivantes sont obligatoires uniquement si une vitesse d'hydrolyse est déterminée:

— tracés des concentrations en fonction du temps pour les substances d'essai et, le cas échéant, pour les produits d'hydrolyse à chaque valeur de pH et température,

— tableaux des résultats de l'équation d'Arrhenius pour la température 20 °C/25 °C, avec pH, constante [h^{-1} ou $jour^{-1}$], demi-vie ou DT_{50}, températures [en °C] y compris les limites de confiance et les coefficients de corrélation (r^2) ou toute information comparable,

— chemin réactionnel d'hydrolyse proposé.

▼B

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) OCDE (1981). Hydrolyse en fonction du pH. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, N° 111, adoptée le 12 mai 1981.

(2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 °C. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(3) Agriculture Canada (1987). Guide d'homologation des pesticides au Canada: chimie et devenir dans l'environnement.

(4) Union européenne (UE) (1995), directive 2001/36/CE de la Commission du 16 mai 2001 portant modification de la directive 91/414/CEE du Conseil concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques. Annexe V: Devenir et comportement dans l'environnement

(5) Commission néerlandaise pour l'enregistrement des pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).

(7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr.23.

(9) OCDE (1993). Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Paris. OCDE (1994-2000): 6e au 1 1e addenda aux Lignes directrices pour les essais de produits chimiques.

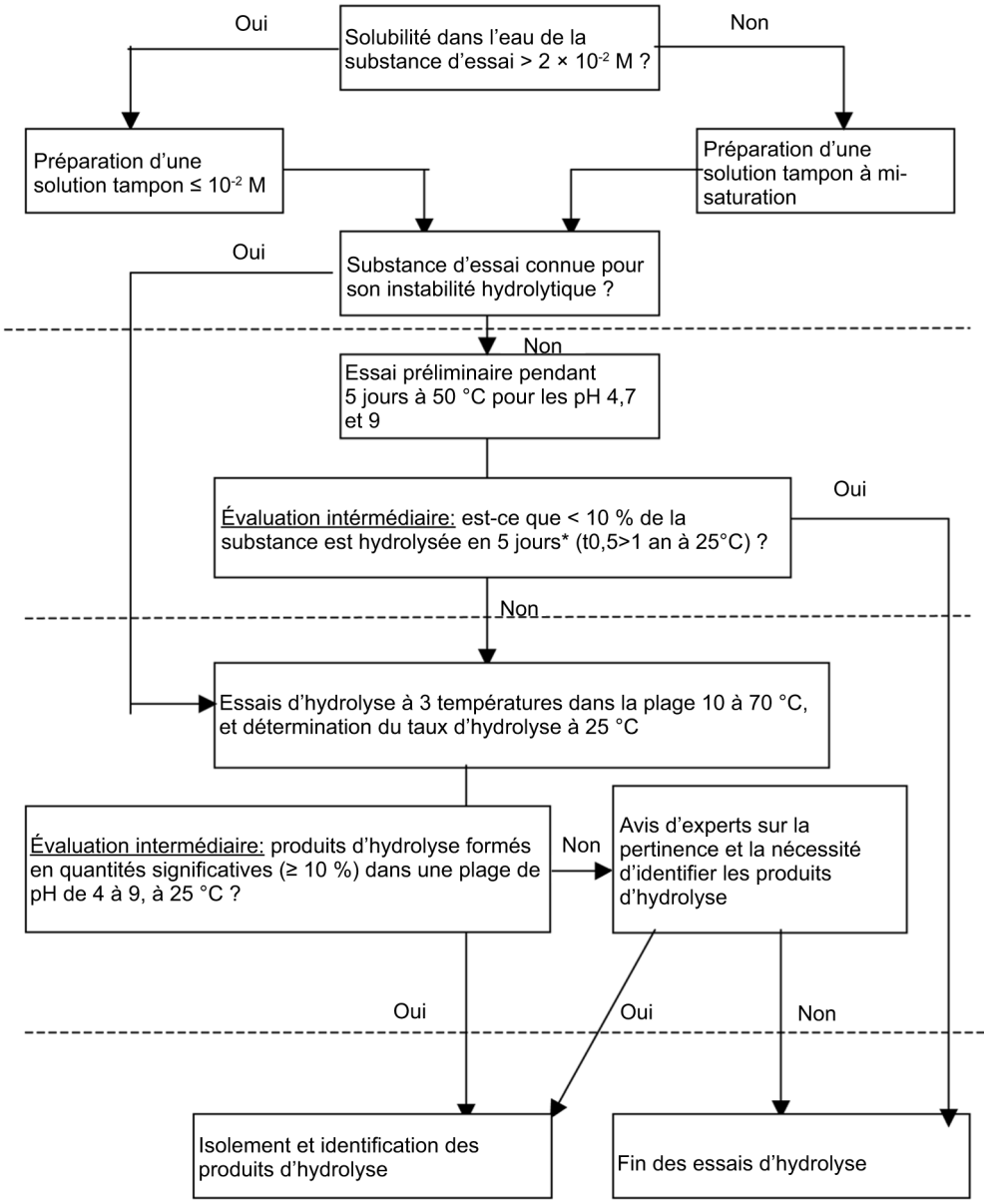
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

(11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-415.

▼B

Annexe 1

Plan de l'essai d'hydrolyse par niveaux



* 10 % d'hydrolyse d'une substance d'essai à 50 °C correspond à une demi-vie de 30 jours approximativement, ce qui correspond à une valeur de 1 an à 25 °C approximativement

▼B

Annexe 2

Définitions et unités

Les unités du système international d'unités (SI) doivent être utilisées.

Substance d'essai: toute substance, qu'il s'agisse du composé parent ou des produits de transformation.

Produits de transformation: toutes les substances résultant des réactions de transformation biotique ou abiotique de la substance d'essai.

Produits d'hydrolyse: toutes les substances résultant des réactions de transformation hydrolytique de la substance d'essai.

L'hydrolyse consiste en la réaction d'une substance d'essai RX avec l'eau, avec échange net du groupe X contre le groupe OH selon la réaction:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Dans ce processus simplifié, la vitesse à laquelle la concentration de RX décroît est donnée par:

vitesse = k $[H_2O]$ [RX] réaction du second ordre

ou

vitesse = k [RX] réaction du premier ordre

selon la phase qui détermine la vitesse. Du fait de la présence d'eau en large excès par rapport à la substance d'essai, ce type de réaction est habituellement décrit comme une réaction de premier ordre, dans laquelle la constante de vitesse observée est donnée par la relation:

$$ko_{bs} = k[H_2O] \qquad [2]$$

et peut être déterminée à partir de l'expression (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

où

t = temps

et C_o, C_t = concentrations de RX au temps 0 et au temps t.

Les unités de cette constante ont les dimensions de $(temps)^{-1}$ et la demi-vie de la réaction (temps au bout duquel 50 % de RX ont réagi) est donnée par:

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

La demi-vie ($t_{0,5}$) est le temps requis pour obtenir 50 % d'hydrolyse d'une substance d'essai lorsque la réaction peut être décrite comme une cinétique du premier ordre. La demi-vie est indépendante de la concentration.

(*) Si le tracé des transformations logarithmiques en fonction du temps n'indique pas une fonction linéaire (ce qui équivaut à une vitesse de réaction du premier ordre), alors l'utilisation de l'équation [3] ne convient pas pour déterminer la constante de vitesse d'hydrolyse de la substance d'essai.

▼B

La DT50 (Disappearance time 50) correspond au laps de temps au bout duquel la concentration de la substance d'essai est réduite de 50 pour cent. Cette valeur est différente de la demi-vie ($t_{0,5}$) lorsque la réaction ne suit pas une cinétique du premier ordre.

Estimation de k à différentes températures

Lorsque les constantes de vitesse sont connues pour deux températures, les constantes de vitesse à d'autres températures peuvent être calculées en utilisant l'équation d'Arrhenius:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ or } \ln\ k = \frac{-E}{R \times T} + \ln\ A$$

Un tracé de ln k en fonction de 1/T donne une ligne droite de pente -E/R

où:

k = constante de vitesse, mesurée à différentes températures

E = énergie d'activation [kJ/mol]

T = température absolue [K]

R = constante des gaz [8,314 J/mol*K]

L'énergie d'activation est calculée par analyse de régression ou par l'équation suivante:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

où: $T_2 > T_1$.

▼B

Annexe 3

Systèmes tampon

A. **CLARK ET LUBS:**

Mélanges tampons de CLARK et LUBS (*)

Composition	pH
HCl 0,2 N et KCl 0,2 N À 20 °C	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl dil. à 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl dil. à 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl dil. to 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl dil. à 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl dil. à 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl dil. à 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl dil. à 100 ml	2,2
Biphtalate de potassium 0,1 M + HCl 0,1 N à 20 °C	
46,70 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	2,2
39,60 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	2,4
32,95 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	2,6
26,42 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	2,8
20,32 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	3,0
14,70 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	3,2
9,90 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	3,4
5,97 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	3,6
2,63 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	3,8
Biphtalate de potassium 0,1 M + NaOH 0,1 N à 20 °C	
0,40 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	4,0
3,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	4,2
7,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	4,4
12,15 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	4,6
17,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	4,8

(*) Ajouter de petits cristaux de thymol ou d'une substance comparable pour éviter la croissance de moisissures.

▼B

Composition	pH
23,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	5,0
29,95 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	5,2
35,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	5,4
39,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	5,6
43,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	5,8
45,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	6,0
Phosphate monopotassique 0,1 M + NaOH 0,1 N à 20 °C	
5,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml	6,0
8,60 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml	6,2
12,60 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml	6,4
17,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml	6,6
23,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml	6,8
29,63 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml	7,0
35,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml	7,2
39,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml	7,4
42,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml	7,6
45,20 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml	7,8
46,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml	8,0
H3B03 0,1 M dans KCl 0,1 M + NaOH 0,1 N à 20 °C	
2,61 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	7,8
3,97 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	8,0
5,90 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	8,2
8,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	8,4
12,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	8,6
16,30 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	8,8
21,30 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	9,0
26,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	9,4
36,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	9,6
40,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	9,8
43,90 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF ET VLEESCHHOUWER:**

Tampons citrate de KOLTHOFF et VLEESCHHOUWER

Composition	pH
Citrate monopotassique 0,1 M et HCl 0,1 N à 18 °C (*)	
49,7 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	2,2
43,4 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	2,4
36,8 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	2,6
30,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	2,8
23,6 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	3,0
17,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	3,2
10,7 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	3,4
4,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	3,6
Citrate monopotassique 0,1 M et NaOH 0,1 N à 18 °C (*)	
2,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	3,8
9,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	4,0
16,3 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	4,2
23,7 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	4,4
31,5 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	4,6
39,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	4,8
46,7 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	5,0
54,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	5,2
61,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	5,4
68,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	5,6
74,4 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	5,8
81,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	6,0

(*) Ajouter de petits cristaux de thymol ou d'une substance comparable pour éviter la croissance de moisissures.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

Mélanges de borate de SÖRENSEN

Composition		Sörensen 18 °C	Walbum, pH à		
ml Borax	ml HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
Borax 0,05 M + HCl 0,1 N					
	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
Borax 0,05 M + NaOH 0,1 N					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

Mélanges de phosphates de SÖRENSEN

Composition	pH
Phosphate monopotassique 0,0667 M + phosphate disodique 0,0667 M à 20 °C	
99,2 ml KH_2PO_4+ 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml KH2PO4+ 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml KH2PO4+ 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml KH_2PO_4+ 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml KH_2PO_4+ 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml KH_2PO_4+ 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml KH_2PO_4+ 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml KH_2PO_4+ 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml KH_2PO_4+ 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼B

53,4 ml KH_2PO_4+ 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml KH_2PO_4+ 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml KH_2PO_4+ 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml KH_2PO_4+ 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml KH_2PO_4+ 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml KH_2PO_4+ 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml KH_2PO_4+ 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼B

C.8. **TOXICITÉ POUR LES VERS DE TERRE**

ESSAI SUR SOL ARTIFICIEL

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Dans cet essai de laboratoire, la substance d'essai est ajoutée à un sol artificiel dans lequel les vers sont placés pendant 14 jours. Au bout de cette période (et facultativement au bout de 7 jours), l'effet létal de la substance sur les vers de terre est examiné. La méthode permet de déterminer assez rapidement l'effet de l'absorption dermique et de l'ingestion des produits chimiques sur les vers de terre.

1.2. DÉFINITION ET UNITÉ

CL_{50}: concentration d'une substance considérée comme responsable de la mort de 50 % des animaux d'expérience pendant la durée de l'essai.

1.3. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Une substance de référence est utilisée périodiquement pour démontrer que la sensibilité du système n'a pas changé de façon significative.

La substance de référence recommandée est le chloracétamide de qualité analytique.

1.4. PRINCIPE DE L'ESSAI

Le sol étant un milieu variable, on utilise pour cet essai un sol limoneux artificiel soigneusement défini. Des vers de terre adultes de l'espèce *Eisenia foetida* (voir note en appendice) sont placés dans un sol artificiel défini, traité par différentes concentrations de la substance d'essai. Le contenu des récipients est étalé sur un plateau 14 jours (et facultativement 7 jours) après le début de l'essai et, pour chaque concentration, les vers de terre survivants sont comptés.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

L'essai est conçu pour être aussi reproductible que possible au point de vue du substrat et de l'organisme. Si la mortalité des témoins dépasse 10 % à la fin de l'essai, celui-ci n'est pas valide.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.6.1. *Matériel*

1.6.1.1. Substrat

On utilise comme substrat de base un sol artificiel bien défini.

a) Substrat de base (les pourcentages sont exprimés en poids sec):

— 10 % de tourbe à sphaignes (de pH aussi proche que possible de 5,5 à 6,0, ne contenant pas de restes de plante visibles et finement broyée),

▼B

— 20 % d'argile kaolinique contenant si possible plus de 50 % de kaolinite,

— environ 69 % de sable quartzique industriel (essentiellement du sable fin contenant plus de 50 % de particules de granulométrie comprise entre 0,05 et 0,2 mm). Si la substance n'est pas suffisamment dispersible dans l'eau, 10 g par récipient doivent être mis de côté pour être mélangés ultérieurement à la substance à tester,

— environ 1 % de carbonate de calcium ($CaCO_3$) pulvérisé, chimiquement pur, pour ajuster le pH à 6,0 ± 0,5.

b) Substrat d'essai:

Le substrat pour les essais contient le substrat de base, la substance d'essai et de l'eau désionisée.

Le teneur en eau est d'environ 25 à 42 % du poids sec du substrat de base. La teneur en eau du substrat est déterminée par séchage d'un échantillon à 105 °C, jusqu'à ce que le poids reste constant. Le critère clé est que le sol artificiel doit être humidifié jusqu'à saturation. Le mélange doit être effectué soigneusement, de manière à obtenir une répartition uniforme de la substance d'essai et du substrat. La façon dont la substance d'essai est introduite dans le substrat doit être indiquée.

c) Substrat témoin:

Le substrat témoin contient le substrat de base et de l'eau. Si l'on utilise un additif, un substrat témoin supplémentaire doit contenir la même quantité d'additif.

1.6.1.2. Récipients

Récipients en verre d'une capacité d'environ 1 litre (convenablement recouverts de couvercles en plastique, de coupelles ou d'une feuille de plastique avec trous d'aération), remplis d'une quantité de substrat d'essai ou de substrat témoin humide équivalant à 500 g de substrat sec.

1.6.2. *Conditions expérimentales*

Les récipients doivent être déposés dans des locaux climatisés dont la température est maintenue à 20 °C ± 2 °C, sous éclairement continu compris entre 400 et 800 lux.

La durée de l'essai est de 14 jours, mais la mortalité peut être déterminée 7 jours après le début de l'essai.

1.6.3. *Méthode*

Concentrations

Les concentrations de la substance d'essai sont exprimées en poids de substance par unité de substrat de base sec (mg/kg).

Essai de sélection des concentrations à utiliser

La gamme des concentrations correspondant à des taux de mortalité allant de 0 à 100 % peut être déterminée par un essai renseignant sur l'intervalle de concentrations à utiliser dans l'essai définitif.

▼B

La substance doit être testée aux concentrations suivantes: 1 000, 100, 10, 1, 0,1 mg de substance/kg de substrat (poids sec).

Si un essai définitif complet est effectué, un lot par concentration et un lot témoin contenant chacun dix vers devraient être suffisants pour l'essai de sélection des concentrations à utiliser.

Essai définitif

Les résultats de l'essai de sélection des concentrations à employer sont utilisés pour choisir au moins 5 concentrations dans une série géométrique couvrant exactement l'intervalle de 0 à 100 % de mortalité et dans un rapport constant inférieur ou égal à 1,8.

Un essai utilisant cette série de concentrations devrait permettre d'évaluer avec la plus grande précision possible la valeur de la CL_{50} et de ses limites de confiance.

Pour l'essai définitif, on utilise au moins 4 lots par concentration et 4 lots témoins contenant chacun 10 vers. Les résultats de ces lots en parallèle sont exprimés sous la forme de moyenne et d'écart type.

Lorsque deux concentrations consécutives dans un rapport de 1,8 ne donnent que 0 % et 100 % de mortalité, ces deux valeurs suffisent à indiquer l'intervalle dans lequel se situe la CL_{50}.

Mélange du substrat de base et de la substance d'essai

Le substrat ne devrait pas, si possible, contenir d'autres additifs que de l'eau. Immédiatement avant le début de l'essai, une émulsion ou une dispersion de la substance d'essai dans de l'eau désionisée ou dans un autre solvant est mélangée au substrat de base ou uniformément projetée à sa surface à l'aide d'un pulvérisateur de chromatographie ou du même type.

Si elle est insoluble dans l'eau, la substance d'essai peut être dissoute dans le plus petit volume possible d'un solvant organique approprié (par exemple hexane, acétone ou chloroforme).

Seuls des agents très volatils peuvent être utilisés pour solubiliser, disperser ou émulsifier la substance d'essai. Avant emploi, le substrat doit être aéré. La quantité d'eau évaporée doit être remplacée. Le substrat témoin doit contenir la même quantité de tout additif.

Si la substance d'essai n'est pas soluble, dispersible ou émulsifiable dans des solvants organiques, 10 g d'un mélange de sable quartzique finement broyé et d'une quantité de substance d'essai correspondant à la dose nécessaire pour traiter 500 g de sol artificiel sec sont mélangés à 490 g de substance d'essai sèche.

Pour chaque lot, une quantité de substrat humide équivalant à 500 g de poids sec est placée dans chaque récipient en verre et 10 vers de terre ayant été conditionnés pendant 24 heures dans un substrat de base humide analogue, puis rincés rapidement, l'eau excédentaire étant absorbée sur un papier-filtre sont placés à la surface du substrat.

▼B

Les récipients sont recouverts de couvercles, de coupelles ou d'une feuille en plastique perforé afin d'éviter le dessèchement du substrat et ils sont maintenus dans les conditions d'essai pendant 14 jours.

Les évaluations doivent être faites au bout de 14 jours (et facultativement de 7 jours). Le substrat est étalé sur une plaque de verre ou d'acier inoxydable. Les vers de terre sont examinés et le nombre de vers de terre survivants est déterminé. Les vers de terre sont considérés comme morts s'ils ne réagissent pas à un léger stimulus mécanique appliqué à leur extrémité antérieure.

Lorsque l'examen est fait au bout de 7 jours, le récipient est à nouveau rempli de substrat et les vers de terre survivants sont replacés sur le même substrat.

1.6.4. *Organismes d'expérience*

Les organismes d'expérience doivent être des *Eisenia foetida* adultes (voir note en appendice) (âgés d'au moins 2 mois, avec clitellum) — poids humide: 300 à 600 mg (pour la méthode d'élevage, voir appendice).

2. RÉSULTATS

2.1. TRAITEMENT ET ÉVALUATION DES RÉSULTATS

Les concentrations de la substance d'essai sont consignées avec les pourcentages correspondants de vers de terre morts.

Si les données sont adéquates, la valeur de la CL_{50} et les intervalles de confiance ($p = 0,05$) sont déterminées à l'aide de méthodes standards (Litchfield et Wilcoxon, 1949 ou méthode équivalente). La CL_{50} doit être exprimée en milligrammes de la substance d'essai par kilogramme de substrat (poids sec).

Dans le cas où la pente de la courbe est trop accentuée pour permettre le calcul de la CL_{50}, il suffira de procéder à une estimation graphique de cette valeur.

Lorsque deux concentrations consécutives dans un rapport de 1,8 ne donnent que 0 ou 100 % de mortalité, ces deux valeurs suffisent à indiquer l'intervalle dans lequel se situe la CL_{50}.

3. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

— attestation de conformité de l'essai aux critères de qualité énoncés ci-dessus,

— essai effectué (essai de détermination des ordres de grandeur et/ou essai définitif),

— description précise des conditions d'essai ou attestation de conformité de l'essai, tout écart par rapport à la méthode étant indiqué,

— description précise de la manière dont la substance d'essai a été mélangée au substrat de base,

— information sur les organismes soumis à l'essai (espèce, âge, poids moyen et gamme de poids, conditions d'élevage, fournisseur),

▼B

— méthode appliquée pour déterminer la CL_{50},

— résultat de l'essai, avec toutes les données utilisées,

— description des symptômes observés ou des modifications du comportement des organismes soumis à l'essai,

— mortalité chez les témoins,

— CL_{50} ou concentration maximale testée n'ayant pas causé de mortalité et concentration minimale testée ayant causé 100 % de mortalité au bout de 14 jours (et facultativement de 7 jours),

— tracé de la courbe concentrations/réponses,

— résultats obtenus avec la substance de référence, au cours du présent essai ou de contrôles antérieurs de la qualité.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) OCDE, Paris, 1981, Ligne directrice 207, décision du Conseil C(81) 30 final.

(2) Edwards, C, A. and Lofty, 1977, *Biology of Earthworms*, Chapman and Hall, London, 331 pages.

(3) Bouche, M- B., 1972, Lombriciens de France, Écologie et Systématique, Institut national de la recherche agronomique, 671 pages.

(4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluating dose-effect experiments, J. Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, 99 pages.

(5) Commission des Communautés européennes, Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR 8714 EN, 1983.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt fur Land- und Forsrwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag «Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden», in: Rudolph/Boje: Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Appendice

Élevage des vers avant les essais

Trente à cinquante vers adultes sont introduits dans un récipient d'élevage contenant du substrat frais et en sont retirés au bout de 14 jours. Ces animaux peuvent être utilisés pour de nouveaux lots d'élevage. Les vers de terre sortis des cocons sont utilisés pour les essais lorsqu'ils sont arrivés à maturité (soit au bout de deux ou trois mois dans les conditions prescrites).

Conditions d'élevage

Local climatisé:	température: 20 °C ± 2 °C, de préférence sous éclairement continu (intensité 400 à 800 lux).
Récipient d'élevage:	récipients creux d'une capacité de 10 à 20 litres.
Substrat:	l'*Eisenia foetida* peut être élevé avec différents excréments animaux. Il est recommandé d'utiliser comme milieu d'élevage un mélange en volume de 50 % de fumier de vache ou de cheval et de 50 % de tourbe. Le milieu doit avoir un pH d'environ 6 ou 7 (ajusté avec du carbonate de calcium) et une faible conductivité ionique (moins de 6 mmhos ou une concentration de sel de 0,5 %). Le substrat doit être humide, mais ne doit pas être trop mouillé. Outre la méthode décrite ci-dessus, d'autres méthodes peuvent être utilisées.

Note: Il existe deux races d'*Eisenia foetida* que certains taxonomistes ont séparées en espèces (Bouche, 1972). Celles-ci sont morphologiquement semblables, mais l'une, *Etsenia foetida foetida*, se distingue par des rayures ou des bandes sur les segments, tandis que l'autre, *Eisenia foetida andrei*, n'en a pas et a une couleur rougeâtre aux nuances variées. Il convient d'utiliser si possible *Eisenia foetida andrei*. D'autres espèces peuvent être utilisées si l'on dispose de la méthodologie nécessaire.

▼B

C.9. **BIODÉGRADATION**

ESSAI DE ZAHN ET WELLENS

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode a pour but d'évaluer la biodégradabilité totale potentielle de substances organiques non volatiles solubles dans l'eau lorsqu'elles sont exposées à des concentrations relativement élevées de micro-organismes lors d'un essai statique.

Il peut y avoir adsorption physico-chimique sur les solides en suspension, et il convient d'en tenir compte lors de l'interprétation des résultats (voir 3.2).

Les substances à étudier sont utilisées dans des concentrations correspondant à des valeurs de COD allant de 50 à 400 mg/litre ou à des valeurs de DCO situées entre 100 et 1 000 mg/litre (COD = carbone organique dissous; DCO = demande chimique en oxygène). Ces concentrations relativement élevées assurent une bonne fiabilité analytique. Les composés possédant des propriétés toxiques peuvent ralentir ou empêcher le processus de dégradation.

Dans cette méthode, on emploie la mesure de la concentration du carbone organique dissous ou la demande chimique en oxygène pour évaluer la biodégradation finale de la substance d'essai.

L'emploi simultané d'une méthode analytique spécifique peut permettre d'évaluer la biodégradation primaire de la substance (disparition de la structure chimique initiale).

La méthode n'est applicable qu'aux substances organiques qui, à la concentration utilisée dans l'essai:

— sont solubles dans l'eau dans les conditions de l'essai,

— ont une pression de vapeur négligeable dans les conditions de l'essai,

— n'ont pas d'effets inhibiteurs vis-à-vis des bactéries,

— ne font pas l'objet d'une adsorption importante sur l'appareillage,

— ne disparaissent pas de la solution par formation de mousse.

Il est utile de connaître les proportions relatives des principaux éléments constitutifs de la substance d'essai pour interpréter les résultats obtenus, notamment lorsque ceux-ci sont peu élevés ou marginaux.

La connaissance de la toxicité de la substance vis-à-vis des micro-organismes peut être intéressante pour interpréter les résultats peu élevés et pour choisir les concentrations d'essai appropriées.

▼B

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Le taux de dégradation obtenu à la fin de l'essai constitue la «biodégradabilité en essai de Zahn et Wellens»:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(_T - C_B)C}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

dans laquelle:

D_T = biodégradation (%) au temps T,

C_A = valeurs du COD (ou de la DCO) du mélange d'essai mesurées 3 heures après le début de l'essai (mg/l) (COD = carbone organique dissous; DCO = demande chimique en oxygène),

C_T = valeurs du COD ou de la DCO du mélange d'essai au moment du prélèvement de l'échantillon (mg/l),

C_B = valeur du COD ou de la DCO du témoin au moment du prélèvement (mg/l),

C_{BA} = valeur du COD ou de la DCO du témoin mesurée 3 heures après le début de l'essai (mg/l).

Le taux de dégradation obtenu est arrondi au pourcentage entier le plus proche.

Le pourcentage de dégradation est défini comme étant le pourcentage de disparition du COD (ou de la DCO) de la substance d'essai.

La différence entre la valeur mesurée après 3 heures et la valeur initiale calculée ou, mieux, mesurée, peut donner des renseignements intéressants sur l'élimination de la substance (voir 3.2: Interprétation des résultats).

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Des substances de référence peuvent parfois être utiles lors de l'étude de substances nouvelles; toutefois, des substances de référence spécifiques ne peuvent pas encore être recommandées.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

On introduit la boue activée, les substances nutritives minérales et une solution aqueuse de la substance à examiner constituant la seule source de carbone dans un récipient en verre de 1 à 4 litres muni d'un agitateur et d'un aérateur. Le mélange est agité et aéré à une température de 20 à 25 °C, en lumière diffuse ou en chambre noire pendant une période pouvant aller jusqu'à 28 jours. Le processus de dégradation est suivi en déterminant la valeur du COD (ou de la DCO) dans la solution filtrée, quotidiennement ou selon une autre périodicité appropriée. Après chaque période, le COD (ou la DCO) éliminé est rapporté à la valeur constatée 3 heures après le début de l'essai et exprimé en pourcentage de biodégradation; cela constitue la mesure du taux de dégradation à ce moment. Le résultat rapporté graphiquement en fonction du temps donne la courbe de biodégradation.

Si on utilise une méthode analytique spécifique, on peut mesurer les variations de la concentration de la molécule originale dues à la biodégradation (biodégradabilité primaire).

▼B

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

La reproductibilité de la méthode a été reconnue satisfaisante lors d'un essai d'intercomparaison

La sensibilité de la méthode est largement déterminée par la variabilité du témoin et, dans une moindre mesure, par la précision de la détermination du carbone organique dissous et de la concentration de la substance dans le milieu d'essai.

1.6. DESCRIPTION

1.6.1. *Préparations*

1.6.1.1. Réactifs

Eau: eau potable contenant moins de 5 mg/l de carbone organique. La concentration totale d'ions calcium et magnésium ne doit pas dépasser 2,7 mmoles/l; si ce n'est pas le cas, corriger la dilution par addition d'eau déionisée ou distillée.

Acide sulfurique, pureté analytique (P.A.): 50 g/l

Solution d'hydroxyde de soude P.A.: 40 g/l

Solution nutritive minérale: dissoudre dans un litre d'eau déionisée:

Chlorure d'ammonium, NH_4C1, P.A.: 38,40 g

Dihydrogénophosphate de sodium, $NaH_2PO_4.2H_2O$, P.A.: 33,40 g

Dihydrogénophosphate de potassium, KH_2PO_4, P.A.: 8,50 g

Monohydrogénophosphate de potassium, K_2HPO_4, P.A.: 21,75 g

Le mélange sert à la fois de milieu nutritif et de solution tampon.

1.6.1.2. Appareillage

Récipients de verre contenant entre 1 et 4 litres (par exemple récipients cylindriques).

Dispositif d'agitation comprenant un agitateur en verre ou en métal fixé à une tige appropriées (l'agitateur doit décrire un mouvement rotatif à environ 5 à 10 cm au-dessus du fond du récipient). On peut utiliser également un agitateur magnétique muni d'un barreau de 7 à 10 cm de long.

Tube d'aération en verre de 2 à 4 mm de diamètre intérieur. L'ouverture du tube doit se trouver à environ 1 cm au-dessus du fond du récipient.

Centrifugeuse (environ 3 550 g).

pH-mètre.

Appareil pour la mesure de l'oxygène dissous.

Filtres papier.

▼B

Appareil de filtration sur membranes.

Membranes filtrantes, porosité: 0,45 µm. Les membranes filtrantes conviennent si elles ne libèrent pas de carbone et n'absorbent pas la substance au stade de la filtration.

Matériel d'analyse pour le dosage du carbone organique et la détermination de la demande chimique en oxygène.

1.6.1.3. Préparation de l'inoculum

Laver la boue activée provenant d'une station d'épuration biologique par centrifugations ou décantations successives dans l'eau utilisée pour l'essai (voir supra).

La boue activée doit avoir les caractéristiques requises. Cette boue peut être obtenue dans une station d'épuration en bon état de fonctionnement. Pour disposer d'autant d'espèces et de souches différentes de bactéries que possible, il peut être préférable de mélanger des inoculums provenant de sources différentes (par exemple de différentes stations d'épuration, d'extraits de sol, des eaux de rivière, etc.). Le mélange doit être traité comme indiqué plus haut.

Pour le contrôle d'activité de la boue activée, voir infra «Contrôle fonctionnel».

1.6.1.4. Préparation des solutions

Dans le récipient d'essai, ajouter 500 ml d'eau (voir supra), 2,5 ml/litre de solution minérale nutritive et une quantité de boues activées correspondant à 0,2-1,0 g/l de matière sèche dans le mélange final. Ajouter suffisamment de solution stock de la substance à tester de façon à obtenir dans le mélange final une concentration de COD de 50 à 400 mg/l. Les valeurs correspondantes de DCO sont 100-1 000 mg/l. Ajouter de l'eau jusqu'à un volume total de 1 à 4 litres. Le volume total choisi dépend du nombre d'échantillons à prélever pour la détermination du COD ou de la DCO et du volume nécessaire pour l'analyse.

Normalement, on considère 2 litres comme un volume satisfaisant. Pour chaque série d'essais, préparer au moins un récipient témoin (blanc) contenant uniquement de la boue activée et la solution minérale nutritive, diluées avec de l'eau jusqu'au même volume total que dans les récipients d'essai.

1.6.2. *Mode opératoire*

Les récipients d'essai sont agités au moyen d'agitateurs magnétiques ou à hélice, en lumière diffuse ou en chambre noire, a une température de 20 à 25 °C. L'aération est assurée par injection d'air comprimé purifié par un filtre d'ouate et si nécessaire par un flacon laveur. Veiller à ce que la boue ne décante pas et que la concentration d'oxygène ne tombe pas au-dessous de 2 mg/l.

Vérifier le pH à intervalles réguliers (par exemple quotidiennement) et l'amener le cas échéant à pH 7-8.

▼B

Les pertes dues à l'évaporation sont compensées juste avant chaque prélèvement d'échantillon au moyen d'eau déionisée ou distillée. Une bonne méthode consiste à marquer le niveau du liquide sur le récipient avant de commencer l'essai. De nouvelles marques sont faites après chaque prélèvement (sans aération ni agitation). Les premiers échantillons sont toujours prélevés 3 heures après le début de l'essai de façon à permettre de détecter une adsorption de la substance d'essai sur la boue activée.

Pour suivre la dégradation de la substance d'essai, effectuer un dosage de COD ou de DCO quotidiennement ou à tout autre intervalle régulier. Filtrer les échantillons provenant du récipient d'essai et du récipient témoin sur un papier filtre soigneusement lavé. Éliminer les 5 premiers millilitres du filtrat de la solution d'essai. Les boues difficilement filtrables peuvent être éliminées au préalable par une centrifugation de 10 minutes. Les déterminations de COD et de DCO sont faites au moins en double. La durée des essais va jusqu'à 28 jours.

Note: Les échantillons restant troubles sont filtrés sur membranes. Celles-ci ne doivent ni libérer ni adsorber de matières organiques.

Contrôle fonctionnel des boues activées

Pour chaque série d'essais, on peut prévoir un récipient contenant une substance connue, de façon à pouvoir vérifier la capacité fonctionnelle de la boue activée. Le diéthylèneglycol s'est révélé utile à cette fin.

Adaptation

Si des analyses sont effectuées à des intervalles relativement courts (par exemple quotidiennement), la courbe de dégradation peut faire clairement apparaître un phénomène d'adaptation (voir figure 2). L'essai ne devrait donc pas être commencé immédiatement avant un week-end.

Si l'adaptation se produit dans les derniers jours de l'essai, celui-ci peut être prolongé jusqu'à dégradation complète.

Note: Si une meilleure connaissance du comportement de la boue adaptée est nécessaire, on exposera à nouveau la même boue activée à la même substance d'essai suivant le mode opératoire ci-après:

Arrêter l'agitateur et l'aérateur et laisser décanter la boue activée. Éliminer le surnageant, remplir d'eau jusqu'à atteindre 2 litres, agiter pendant 15 minutes et laisser à nouveau décanter. Éliminer à nouveau le surnageant, et utiliser la boue restante pour répéter l'essai avec la même substance conformément aux paragraphes 1.6.1.4 et 1.6.2 ci-dessus. La boue activée peut également être séparée par centrifugation plutôt que par décantation.

La boue adaptée peut être mélangée avec de la boue fraîche pour atteindre 0,2 à 1 g de matière sèche par litre.

▼B

Analyses

En général, on filtre les échantillons sur papier-filtre soigneusement lavé à l'eau déionisée.

Les échantillons qui restent troubles sont filtrés sur membranes (0,45 μm).

Déterminer la concentration de COD en double dans les filtrats des échantillons (éliminer les cinq premiers millilitres), à l'aide d'un appareil de mesure du COT. Si l'analyse du filtrat ne peut être faite le jour même, le conserver au réfrigérateur jusqu'au lendemain. Il est déconseillé de la conserver plus longtemps.

Déterminer la concentration de DCO dans les filtrats d'échantillon à l'aide du dispositif d'analyse de la DCO conformément au mode opératoire décrit dans la référence (2) ci-après.

2. **ÉVALUATION DES DONNÉES**

Procéder au moins à deux déterminations de la concentration de COD et de DCO dans les échantillons, conformément aux indications fournies ci-dessus au paragraphe 1.6.2. Calculer le pourcentage de dégradation au temps T suivant la formule (avec ses définitions) donnée au paragraphe 1.2 ci-dessus.

Arrondir le taux de dégradation à l'unité de pourcentage la plus proche. Le taux de dégradation atteint à la fin de l'essai constitue la «biodégradabilité dans l'essai de Zahn-Wellens».

Note: Si la dégradation complète est réalisée avant la fin de la durée de l'essai et si ce résultat est confirmé par une seconde analyse effectuée le lendemain, il peut être mis fin à l'essai.

3. **PRÉSENTATION DES RÉSULTATS**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal de l'essai contiendra, si possible:

— la concentration initiale de la substance,

— toutes autres indications et les résultats expérimentaux relatifs à la substance testée, à la substance de référence éventuelle, et au témoin,

— la concentration après trois heures,

— la courbe de biodégradation avec description,

— la date et l'endroit du prélèvement de l'inoculum, stade d'adaptation, concentration utilisée, etc.,

— les raisons scientifiques d'éventuelles modifications de la procédure d'essai.

3.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'élimination du COD (ou de la DCO) qui se produit graduellement pendant un certain nombre de jours ou de semaines indique que la substance testée se dégrade biologiquement.

▼B

Cependant, une adsorption physico-chimique peut jouer un rôle dans certains cas: ceci est montré lorsqu'il y a élimination totale ou partielle de la substance dès le début, lors des 3 premières heures, et que la différence entre le surnageant des milieux témoins et d'essai reste faible.

Des essais supplémentaires sont nécessaires si l'on doit faire la distinction entre biodégradation (ou biodégradabilité partielle) et adsorption.

Il y a pour cela plusieurs méthodes, la meilleure étant d'employer le surnageant comme inoculum dans un essai du niveau de base (de préférence un essai respirométrique).

Les substances donnant dans cet essai une élimination élevée, non liée a l'adsorption du COD (ou de la DCO) devraient être considérées comme potentiellement biodégradables. Une élimination partielle, non liée à l'adsorption, indique que le produit chimique est au moins biodégradable dans une certaine mesure. Une élimination faible ou nulle de COD (DCO) peut être due à l'inhibition des micro-organismes par la substance testée; ceci peut être révélé par lyse et perte de boue donnant des surnageants troubles. L'essai devrait être répété avec une concentration plus faible de substance.

L'emploi d'une méthode analytique spécifique ou d'une substance d'essai marquée au ^{14}C peut permettre une plus grande sensibilité. Dans le cas de composés marqués au ^{14}C, la récupération de $^{14}CO_2$ confirmera qu'il y a eu biodégradation.

Quand les résultats sont exprimés en termes de biodégradation primaire, il conviendrait de fournir dans la mesure du possible une explication concernant le changement de structure chimique qui a conduit à une diminution de réponse de la substance d'origine.

La validation de la méthode analytique doit être accompagnée de l'indication de la réponse trouvée avec le témoin.

4. **RÉFÉRENCES**

(1) OCDE, Paris, 1981, Ligne directrice 302 B, décision du Conseil C(81) 30 final.

(2) Annexe V, C. 9. «Dégradation: demande chimique en oxygène», de la directive 84/449/CEE, Journal officiel des Communautés européennes n° L 251 du 19 septembre 1984.

▼B

Appendice

EXEMPLE D'ÉVALUATION

Composé organique:	acide 4-éthoxybenzoïque
Concentration théorique:	600 mg/l
COD théorique:	390 mg/l
Inoculum:	Station d'épuration des eaux d'égout de ...
Concentration;	1 gramme de matière sèche par litre
État d'adaptation:	non adapté
Analyse:	détermination du COD
Volume de l'échantillon:	3 ml
Substance de contrôle:	diethylèneglycol
Toxicité du composé:	sans effet toxique au-dessous de 1 000 mg/l Essai pratique: essai des tubes de fermentation.

Temps	Substance de contrôle				Substance à étudier		
	Blanc COD (1) mg/l	COD (1) mg/l	COD net mg/l	Dégradation %	COD (1) mg/l	COD net mg/l	Dégradation %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 heures	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 jour	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 jours	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 jours	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 jours	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 jours	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 jours	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 jours	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 jours	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Valeurs moyennes de trois déterminations.

▼B

Figure 1

Exemples de courbes de biodégradation

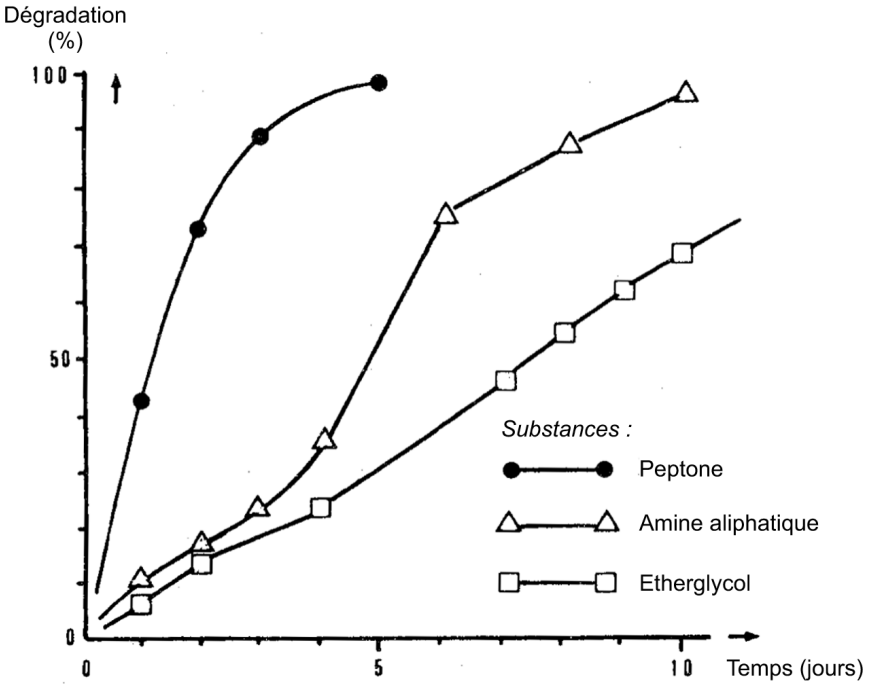
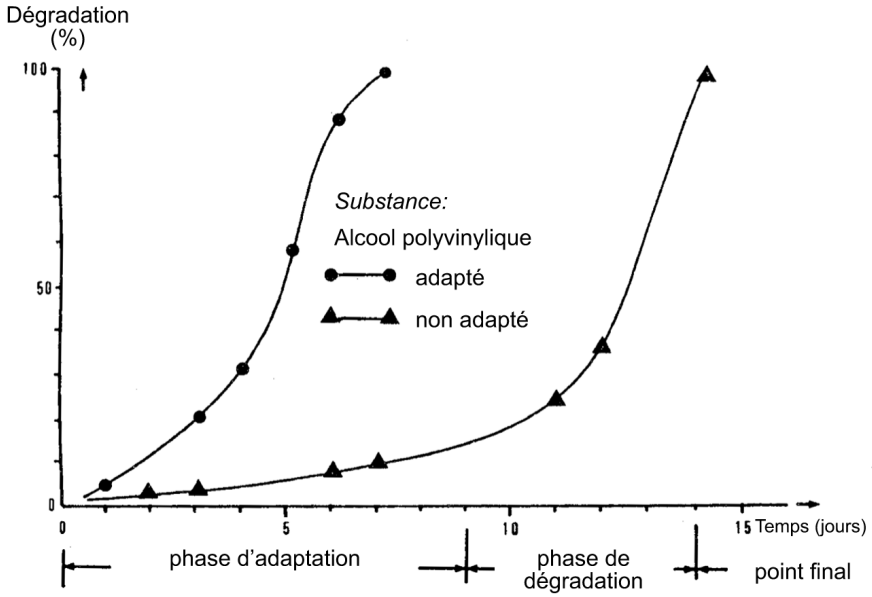


Figure 2

Exemples d'adaptation d'une boue



▼M4

C.10. **ESSAI DE SIMULATION – TRAITEMENT AÉROBIE DES EAUX USÉES: C.10-A: UNITÉS DE TRAITEMENT PAR BOUES ACTIVÉES – C.10-B: BIOFILMS**

C.10-A: Unités de traitement par boues activées

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 303 (2001) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Dans les années 50, on s'est rendu compte que les nouveaux tensioactifs provoquaient un gonflement excessif de la mousse dans les stations de traitement des eaux usées et les cours d'eau. Ils n'étaient pas complètement éliminés par le traitement aérobie et limitaient dans certains cas l'élimination d'autres matières organiques. Ce constat a été à l'origine de nombreuses études sur les moyens d'éliminer les tensioactifs des eaux usées et sur les possibilités d'application des nouvelles substances chimiques produites par l'industrie au traitement des eaux usées. Des modèles d'unités représentant les deux principaux types de traitement biologique aérobie des eaux usées (boues activées et lits à ruissellement, ou lits bactériens) ont été utilisés à cette fin. Il aurait en effet été peu commode et très coûteux de répartir chaque nouvelle substance entre différentes stations de traitement à grande échelle et d'assurer un suivi des essais, même au niveau local.

CONSIDÉRATIONS INITIALES

Unités de traitement par boues activées

2. Les descriptions de modèles d'unités à boues activées mentionnent des dimensions comprises entre 300 ml et environ 2 000 ml. Certaines unités, répliques assez fidèles de stations en vraie grandeur, comportaient des bassins de décantation où les boues séjournaient avant d'être renvoyées par pompage dans le bassin d'aération, tandis que d'autres n'étaient pas équipées pour cette opération, par exemple le modèle de Swisher (1). La dimension de l'appareil résulte d'un compromis: il doit être assez grand pour fonctionner correctement sur le plan mécanique et traiter un volume d'échantillons suffisant sans que son fonctionnement en soit altéré et, d'autre part, il ne doit pas occuper trop d'espace ni demander une quantité de matériel excessive.

3. Deux types d'appareils, appliqués au départ à l'étude des tensioactifs, ont été abondamment utilisés avec des résultats satisfaisants: les unités d'Husmann (2) et les unités à vase poreux (3) (4), qui sont décrites dans la présente méthode d'essai. D'autres unités ont également fait leurs preuves, par exemple celle d'Eckenfelder (5). Compte tenu du coût relativement élevé et des efforts exigés par la conduite de cet essai de simulation, des essais de sélection plus simples et moins onéreux, qui figurent à présent au chapitre C.4-A à F de la présente annexe (6), ont été étudiés en parallèle. L'expérience acquise avec de nombreux tensioactifs et d'autres produits chimiques a montré que ceux qui donnaient un résultat positif aux essais de sélection (facilement biodégradables) se dégradaient aussi au cours de l'essai de simulation. Certaines des substances rejetées par les essais de sélection étaient acceptées d'après les essais de biodégradabilité intrinsèque [chapitres C.12 (7) et C.19 (8) de la présente annexe] mais une partie seulement des substances formant ce dernier groupe se dégradait au cours de l'essai de simulation, tandis que les substances écartées par les essais de biodégradabilité intrinsèque n'étaient pas dégradées au cours des essais de simulation (9) (10) (11).

4. Les essais de simulation conduits sous une seule combinaison de conditions expérimentales suffisent à remplir certains objectifs; les résultats sont exprimés en pourcentage d'élimination de la substance d'essai ou du carbone organique dissous (COD). Ce type d'essai est décrit dans la présente méthode d'essai. Toutefois, contrairement à la précédente version du présent chapitre, qui n'abordait qu'un seul type d'appareil traitant des eaux usées synthétiques en mode couplé suivant une méthode relativement

▼M4

grossière d'épuisement des boues, le présent texte propose plusieurs variations. Il présente plusieurs options concernant les types d'appareil, les modes de fonctionnement, les eaux usées et l'évacuation des boues épuisées. Il s'aligne étroitement sur la norme ISO 11733 (12), qui a été examinée très attentivement durant sa préparation, bien que la méthode n'ait pas fait l'objet d'un essai circulaire.

5. Pour d'autres objectifs, il est nécessaire de connaître la concentration de la substance d'essai dans l'effluent avec plus de précision, ce qui demande une méthode plus élaborée. Le débit des boues épuisées, par exemple, doit subir un contrôle plus précis durant chaque journée d'essai et sur toute la période de l'essai, et il faut faire tourner les unités à plusieurs débits de boues épuisées. Pour que l'étude soit plus complète, les essais doivent aussi être menés à deux ou trois températures différentes: le mode opératoire est exposé par Birch (13) (14) et résumé à l'appendice 6. Toutefois, les connaissances actuelles ne permettent pas de décréter quels modèles cinétiques sont applicables à la biodégradation des produits chimiques lors du traitement des eaux usées et dans le milieu aquatique en général. La cinétique de Monod, donnée à titre d'exemple à l'appendice 6, est limitée aux substances dont la concentration atteint au moins 1 mg/l, mais de l'avis de certains, même sous cette condition, cela reste à démontrer. Des essais réalisés à des concentrations plus proches de celles trouvées dans les eaux usées sont présentés à l'appendice 7, mais ces essais et ceux de l'appendice 6 ne figurent qu'en appendices et ne font pas l'objet de méthodes d'essai.

Lits

6. Les modèles de lits percolateurs ont beaucoup moins retenu l'attention, sans doute parce qu'ils sont plus encombrants et moins compacts que les modèles de stations à boues activées. Gerike *et al.* ont mis au point des unités à lits percolateurs qu'ils ont fait fonctionner en mode couplé (15). Ces lits étaient relativement grands (hauteur 2 m; volume 60 l) et demandaient pas moins de 2 l/h d'eaux usées chacun. Baumann *et al.* (16) ont simulé des lits percolateurs en insérant dans des tubes de 1 m (14 mm de diamètre interne) des bandes de polyester «velues» préalablement plongées dans des boues activées concentrées pendant 30 minutes. La substance d'essai, qui constituait la seule source de carbone dans une solution de sels minéraux, était introduite par le haut du tube vertical et la biodégradation était évaluée d'après les mesures du COD dans l'effluent et du CO_2 dans les dégagements gazeux.

7. Les filtres biologiques ont été simulés d'une autre manière (15): on a alimenté les surfaces internes de tubes rotatifs légèrement inclinés par rapport à l'horizontale d'eaux usées (environ 250 ml/h) avec et sans la substance d'essai, puis recueilli les effluents pour analyse du COD et/ou de la substance d'essai étudiée.

PRINCIPE DE L'ESSAI

8. Cette méthode a été conçue pour déterminer l'élimination et la biodégradation primaire et/ou finale de substances organiques solubles dans l'eau par des micro-organismes aérobies dans un système d'essai à fonctionnement continu et simulant l'action des boues activées. Un milieu organique facilement biodégradable et la substance d'essai organique forment la source de carbone et d'énergie des micro-organismes.

9. Deux unités d'essai à fonctionnement continu (stations à boues activées ou vases poreux) tournent en parallèle dans des conditions identiques choisies en fonction de la finalité de l'essai. Normalement, le temps de rétention hydraulique moyen est de 6 h et l'âge moyen des boues (temps de rétention des boues) est de 6 à 10 jours. Les boues sont épuisées par application de l'une des deux méthodes et la substance d'essai est habituellement ajoutée à une concentration comprise entre 10 et 20 mg/l de carbone organique dissous (COD) aux eaux à traiter (milieu organique) d'une seule des unités. La deuxième unité sert de témoin pour déterminer la biodégradation dans le milieu organique.

▼M4

10. Le COD, de préférence, ou la demande chimique en oxygène (DCO), ainsi que la concentration de la substance d'essai (si nécessaire), sont déterminés par une analyse spécifique conduite sur des échantillons d'effluents fréquemment prélevés de l'unité qui reçoit la substance d'essai. On suppose que la différence de concentration du COD ou de la DCO dans les effluents de l'unité d'essai et de l'unité témoin est due à la substance d'essai ou à ses métabolites organiques. On la compare ensuite à la concentration du COD ou de la DCO dans les eaux à traiter attribuable à la substance d'essai, afin de déterminer les quantités de substance d'essai éliminées.

11. On parvient normalement à distinguer la biodégradation de la bioadsorption en étudiant attentivement la courbe d'élimination en fonction du temps, et elle peut ordinairement être confirmée par un essai de biodégradabilité immédiate conduit à l'aide d'un inoculum acclimaté provenant de l'unité qui reçoit la substance d'essai.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

12. Il est nécessaire de connaître la pureté, la solubilité dans l'eau, la volatilité et les caractéristiques d'adsorption de la substance d'essai pour être en mesure d'interpréter les résultats correctement. Les substances volatiles et insolubles ne peuvent normalement être testées sans précautions particulières (voir appendice 5). Il faudrait connaître également la formule chimique développée ou, au moins, empirique, pour calculer les valeurs théoriques et/ou vérifier les valeurs mesurées de paramètres tels que la demande théorique en oxygène (DthO), le carbone organique dissous (COD) et la demande chimique en oxygène (DCO).

13. Des données sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes (voir appendice 4) peuvent aussi être utiles à la sélection des concentrations d'essai appropriées, et essentielles pour l'interprétation correcte de faibles valeurs de biodégradation.

NIVEAUX DE SEUIL

14. Dans l'application initiale de cet essai de simulation (de confirmation) à la biodégradation primaire des tensioactifs, la mise sur le marché du tensioactif était subordonnée à un taux d'élimination supérieur à 80 pour cent. À défaut d'atteindre un taux de 80 pour cent, on peut mener cet essai de simulation (de confirmation) à l'issue duquel le tensioactif ne sera mis sur le marché que s'il est éliminé à plus de 90 pour cent. En général, avec les produits chimiques, la question d'un résultat d'essai positif ou négatif n'entre pas enjeu, et le pourcentage d'élimination obtenu peut servir à calculer en gros la concentration probable dans l'environnement à introduire dans l'évaluation des risques dus aux substances chimiques. Les résultats ont tendance à être de type tout ou rien. Le pourcentage d'élimination du COD atteint dans plusieurs études sur des substances chimiques pures était supérieur à 90 pour cent pour plus des trois quarts des produits chimiques présentant un degré de biodégradabilité significatif et supérieur à 80 pour cent pour plus de 90 pour cent d'entre eux.

15. Relativement peu de substances chimiques, par exemple des tensioactifs, sont présentes dans les eaux usées aux concentrations (environ 10 mg C/l) appliquées dans cet essai. Certains produits chimiques peuvent être inhibiteurs à de telles concentrations, tandis que la cinétique d'élimination d'autres substances risque d'être différente aux faibles concentrations. Il est possible d'évaluer la dégradation avec plus de précision en recourant à des méthodes modifiées et en choisissant des concentrations de la substance d'essai réalistement faibles; les résultats obtenus pourraient servir à calculer les constantes cinétiques. Cependant, non seulement les techniques expérimentales ne sont pas encore entièrement validées, mais les modèles cinétiques, qui reproduisent les réactions de biodégradation, n'ont pas été établis (voir appendice 7).

▼M4

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

16. Pour s'assurer que le mode opératoire est correctement suivi, il est quelquefois utile de tester des substances dont le comportement est connu, parallèlement aux substances d'essai étudiées. Il s'agit notamment de l'acide adipique, du 2-phénylphénol, du bnaphthol, de l'acide diphénique, de l'acide 1-naphthoïque, etc. (9) (10) (11).

REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS DES ESSAIS

17. Il existe beaucoup moins de rapports d'essais de simulation que de rapports d'essais de biodégradabilité immédiate. La reproductibilité entre essais conduits simultanément est bonne (de 10 à 15 pour cent) pour des substances d'essai dégradées à 80 pour cent ou plus, mais la variabilité augmente pour les substances moins bien dégradées. Certaines substances limites ont donné des résultats très disparates (par exemple 10 pour cent, 90 pour cent) à différentes reprises au cours des neuf semaines de l'essai.

18. Les résultats obtenus à l'aide des deux types d'appareils ne différaient guère, mais certaines substances ont subi une dégradation plus poussée et plus constante avec les eaux usées domestiques qu'avec les eaux usées synthétiques reconstituées selon la formule de l'OCDE.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Appareils

Système d'essai

19. Le système d'essai d'une seule substance comprend une unité d'essai et une unité témoin, mais les analyses spécifiques (biodégradation primaire) ne demandent qu'une unité d'essai. Une unité témoin peut servir à plusieurs unités d'essai recevant des substances d'essai identiques ou différentes. En cas de couplage (appendice 3), chaque unité d'essai doit avoir sa propre unité témoin. Le système d'essai peut consister en un modèle de station à boues activées: unité d'Husmann (appendice 1, figure 1) ou vase poreux (appendice 1, figure 2). Dans les deux cas, il faut employer des récipients de stockage de capacité suffisante pour accueillir les eaux à traiter et les effluents ainsi que des pompes pour doser les eaux à traiter, mélangés ou non à la solution contenant la substance d'essai.

20. Chaque unité à boues activées se compose d'un récipient d'aération d'une capacité connue de quelque trois litres de boues activées et d'un décanteur secondaire qui contient environ un litre et demi; il est possible de modifier les volumes dans une certaine mesure en ajustant la hauteur du décanteur. L'utilisation de récipients de dimensions différentes est permise à condition de leur faire supporter des charges hydrauliques comparables. S'il n'y a pas moyen de maintenir la température de l'enceinte d'essai dans la gamme souhaitée, on recommande d'employer des récipients à chemise d'eau thermostatée. Les boues activées du décanteur sont ramenées dans le récipient d'aération, en continu ou à intervalles réguliers, à l'aide d'un émulseur à air ou d'une pompe doseuse, pour y être recyclée.

21. Le système du vase poreux consiste en un cylindre poreux à fond conique placé à l'intérieur d'un récipient légèrement plus grand de la même forme, mais fabriqué en matière plastique imperméable. Le matériau qui convient au cylindre poreux est du polyéthylène de 2 mm d'épaisseur dont les pores n'excèdent pas 90 μm. La séparation des boues et du milieu organique traité est opérée par un passage différentiel à travers la paroi poreuse. Les effluents se déversent dans l'espace annulaire d'où ils débordent dans le récipient collecteur. Aucune décantation n'a lieu, si bien qu'il n'y a pas de retour de boues. L'ensemble du système peut être monté dans un bain-marie thermostaté. Les vases poreux s'obstruent et risquent de déborder au début.

▼M4

Si cela se produit, il faut remplacer le revêtement poreux interne par un revêtement propre en commençant par siphonner les boues du vase dans un seau propre avant d'enlever le revêtement obstrué. Après avoir essuyé le cylindre imperméable extérieur, on place un revêtement propre et on remet la boue dans le vase. Si des boues adhèrent sur les côtés du revêtement obstrué, celles-ci doivent être soigneusement grattées et transférées. Le nettoyage des vases obstrués s'effectue d'abord à l'aide d'un mince jet d'eau pour enlever les boues restantes, ensuite par trempage dans une solution diluée d'hypochlorite de sodium, puis dans l'eau, et s'achève par un rinçage complet à l'eau.

22. Il convient d'appliquer des techniques appropriées à l'aération des boues dans les récipients d'aération des deux systèmes, par exemple des cubes frittés (pierres diffuseuses) et de l'air comprimé. Si nécessaire, l'air sera épuré par passage à travers un filtre convenable, et lavé. Une quantité d'air suffisante doit être insufflée dans le système pour maintenir l'aérobiose et conserver les boues à l'état de floc pendant toute la durée de l'essai.

Appareil de filtration ou centrifugeuse

23. Les échantillons seront filtrés à travers une membrane possédant une porosité adéquate (diamètre d'ouverture nominal de 0,45 μm) qui adsorbe les substances organiques solubles et libère le moins possible de carbone organique. Si les lits utilisés libèrent du carbone organique, il faut les laver soigneusement à l'eau chaude afin d'évacuer le carbone organique lixiviable. Une centrifugeuse tournant à 40 000 m/s^2 peut remplacer l'appareil de filtration.

Matériel d'analyse

24. Appareils permettant de déterminer:

— le COD (carbone organique dissous) et le COT (carbone organique total), ou la DCO (demande chimique en oxygène),

— la substance donnée, s'il y a lieu,

— les solides en suspension, le pH, la concentration d'oxygène dans l'eau,

— la température, l'acidité, l'alcalinité,

— l'ammonium, les nitrites et les nitrates, si l'essai est réalisé dans des conditions nitrifiantes.

Eau

25. Eau du robinet renfermant moins de 3 mg/l de COD. Mesurer l'alcalinité si elle est inconnue.

26. Eau désionisée contenant moins de 2 mg/l de COD.

Milieu organique

27. Les eaux usées synthétiques, les eaux usées domestiques ou un mélange des deux sont acceptés comme milieu organique. Il a été démontré (11) (14) que les eaux usées domestiques employées seules augmentaient souvent le pourcentage d'élimination du COD et entraînaient même l'élimination et la biodégradation de certaines substances chimiques non biodégradées par les eaux usées synthétiques formulées selon l'OCDE. En outre, l'addition constante ou intermittente d'eaux usées domestiques stabilise souvent les boues activées, y compris sa capacité à décanter convenablement, laquelle est déterminante. Aussi préconise-t-on l'utilisation d'eaux usées domestiques. On mesure la concentration du COD ou de la DCO. L'acidité ou l'alcalinité du milieu organique doivent être connues. Il peut être nécessaire de tamponner le milieu organique par un composé approprié (hydrogénocarbonate de sodium ou dihydrogénophosphate de potassium) s'il est faiblement acide ou alcalin, pour maintenir le pH à environ 7,5 ± 0,5 dans le récipient d'aération durant l'essai. La quantité de tampon à ajouter et le moment de cette addition seront décidés au cas par cas. Lorsqu'on utilise des mélanges de façon continue ou intermittente, le COD (ou la DCO) de ces mélanges doivent être maintenus à une valeur à peu près constante, par exemple par dilution dans l'eau.

▼M4

Eaux usées synthétiques

28. Dans chaque litre d'eau du robinet, dissoudre 160 mg de peptone, 110 mg d'extrait de viande, 30 mg d'urée, 28 mg d'hydrogénophosphate de potassium anhydre (K_2HPO_4), 7 mg de chlorure de sodium (NaCl), 4 mg de chlorure de calcium dihydraté ($CaCl_2.2H_2O$) et 2 mg de sulfate de magnésium heptahydraté ($Mg_2SO_4.7H_20$). Cette eau usée synthétique formulée selon l'OCDE offre un exemple où la concentration moyenne de COD dans les eaux à traiter atteint quelque 100 mg/l. Utiliser en alternance d'autres compositions donnant à peu près la même concentration de COD, plus proches des eaux usées domestiques. Si les eaux à traiter doivent être moins concentrées, diluer les eaux usées synthétiques, à 1/1 par exemple, dans de l'eau du robinet afin d'obtenir une concentration d'environ 50 mg/l. Ces eaux à traiter «allégées» favoriseront la croissance des organismes nitrifiants; cette modification devra être mise à profit au cas où s'avère nécessaire l'étude de la simulation de stations d'épuration des eaux usées en régime nitrifiant. Ces eaux usées synthétiques, à base d'eau distillée, peuvent être confectionnées sous une forme concentrée et stockées à environ 1 °C pendant une semaine au maximum. Selon les besoins, diluer avec de l'eau du robinet (ce milieu n'est pas satisfaisant, notamment parce qu'il présente une concentration en azote très élevée et une teneur en carbone relativement faible, mais rien de mieux n'a été suggéré, en dehors d'un apport supplémentaire de tampon phosphate et de peptone).

Eaux usées domestiques

29. Utiliser des eaux usées qui viennent d'être décantées, recueillies quotidiennement dans une station d'épuration qui reçoit principalement des eaux usées domestiques. Elles doivent être prélevées avant la sédimentation primaire, au niveau du déversoir de la cuve de sédimentation primaire ou dans les eaux brutes de la station de traitement par boues activées. Les eaux usées peuvent être utilisées après plusieurs jours de stockage (généralement pas plus de sept) à environ 4 °C, s'il est prouvé que le COD (ou la DCO) n'ont pas diminué de manière significative (c'est-à-dire de moins de 20 pour cent) durant le stockage. Afin de limiter la perturbation du système, il conviendrait d'ajuster le COD (ou la DCO) de chaque nouveau lot avant son utilisation à une valeur constante adéquate, par exemple en le diluant avec de l'eau du robinet.

Boues activées

30. Prélever les boues activées destinées à l'inoculation dans la cuve d'aération d'une station d'épuration des eaux usées correctement exploitée ou d'une unité à boues activées conçue à l'échelle expérimentale traitant principalement des eaux usées domestiques.

Solutions mères de la substance d'essai

31. Pour les substances présentant une solubilité convenable, préparer des solutions mères aux concentrations appropriées (par exemple, 1 à 5 g/l) dans de l'eau désionisée, ou dans la fraction minérale de l'eau usée synthétique. En ce qui concerne les substances insolubles et volatiles, se reporter à l'appendice 5. Déterminer le COD et le carbone organique total (COT) de la solution mère et répéter les mesures à chaque nouveau lot. Si la différence entre le COD et le COT excède 20 pour cent, il faut vérifier l'hydrosolubilité de la substance d'essai. Comparer le COD ou la concentration de la substance d'essai mesurée par une analyse spécifique de la solution mère à la valeur nominale, pour s'assurer que la récupération est suffisante (elle doit normalement dépasser 90 pour cent). Vérifier, en particulier pour les dispersions, si le COD peut être utilisé comme paramètre d'analyse ou si seule une technique d'analyse spécifique de la substance d'essai est applicable. Les dispersions imposent la centrifugation des échantillons. Pour chaque nouveau lot, mesurer le COD, la DCO, ou la substance d'essai par une analyse spécifique.

▼M4

32. Déterminer le pH de la solution mère. Les valeurs extrêmes indiquent que l'addition de la substance est susceptible d'influencer le pH des boues activées dans le système d'essai. Dans ce cas, il faut neutraliser la solution mère à pH 7 ± 0,5 avec de faibles quantités d'un acide ou d'une base inorganiques, tout en évitant la précipitation de la substance d'essai.

MODE OPÉRATOIRE

33. Le mode opératoire est décrit pour les unités à boues activées; pour le système du vase poreux, il doit être légèrement adapté.

Préparation de l'inoculum

34. Au début de l'essai, inoculer le système d'essai avec des boues activées ou un inoculum contenant une faible concentration de micro-organismes. L'inoculum est conservé dans un endroit aéré à température ambiante avant d'être utilisé dans les 24 heures. Dans le premier cas, on prélève un échantillon de boues activées de la cuve d'aération d'une station d'épuration biologique des eaux usées exploitée avec efficacité ou d'une installation de traitement de laboratoire qui soit essentiellement alimentée par des eaux usées domestiques. S'il y a lieu de simuler des conditions nitrifiantes, collecter les boues d'une station de traitement des eaux usées en régime nitrifiant. Déterminer la concentration des solides en suspension et, si nécessaire, concentrer les boues par décantation pour que le volume ajouté au système d'essai soit minimal. Vérifier que la teneur en matière sèche de départ tourne autour de 2,5 g/l.

35. Dans le deuxième cas, 2 ml/l à 10 ml/l d'un effluent d'une station d'épuration biologique des eaux usées constitueront l'inoculum. Afin de réunir autant d'espèces bactériennes que possible, il peut être utile d'ajouter des inoculums de diverses autres sources, par exemple les eaux de surface. Dans ces conditions, les boues activées vont se former et se développer dans le système d'essai.

Dosage du milieu organique

36. Nettoyer méticuleusement les récipients destinés à recevoir les eaux à traiter et les effluents ainsi que les tuyaux reliant ces deux récipients, afin de prévenir toute prolifération de micro-organismes, au début de l'essai et tout au long de celui-ci. Assembler les systèmes d'essai dans une pièce thermostatée (normalement entre 20 et 25 °C) ou utiliser des unités d'essai à chemise d'eau. Préparer un volume suffisant du milieu organique requis (paragraphes 27-29). Commencer par remplir le récipient d'aération et le décanteur avant d'introduire l'inoculum (paragraphes 34, 35). Actionner le dispositif d'aération de telle sorte que les boues soient maintenues en suspension et en aérobiose, et entamer le dosage des eaux à traiter et le recyclage des boues décantées. Doser le milieu organique des récipients de stockage et introduire ce dernier dans les récipients d'aération (paragraphes 20, 21) des unités d'essai et témoin et recueillir leurs effluents respectifs dans des récipients de stockage similaires. Le temps de rétention hydraulique normal de 6 heures sera assuré par un pompage du milieu organique à raison de 0,5 l/h. Pour confirmer ce débit, mesurer la quantité quotidienne de milieu organique dosé en enregistrant la diminution de volume du milieu dans les récipients de stockage. Il faudrait faire appel à d'autres méthodes de dosage pour déterminer les effets du déversement intermittent et du traitement de «choc» par des produits chimiques.

37. Si le milieu organique est préparé en vue d'une utilisation dont la durée dépasse un jour, il y a lieu de le réfrigérer à environ 4 °C ou de le conserver par une autre méthode adéquate, afin de prévenir la croissance des micro-organismes et la biodégradation en dehors des unités d'essai (paragraphe 29). Si l'on emploie une eau usée synthétique, il est possible de préparer et d'entreposer à environ 4 °C une solution mère concentrée (par exemple dix fois la concentration normale, voir paragraphe 28). Cette solution mère peut être convenablement mélangée à un volume adéquat d'eau du robinet avant usage, ou être pompée directement, tandis que le volume adéquat d'eau du robinet est pompé séparément.

▼M4

Dosage de la substance d'essai

38. Un volume approprié de la solution mère de la substance d'essai (paragraphe 31) est introduit dans le récipient de stockage des eaux à traiter ou dosé directement, à l'aide d'une autre pompe, dans le récipient d'aération. La concentration d'essai moyenne normale dans les eaux à traiter doit se situer entre 10 mg/l et 20 mg/l de COD, et la concentration maximale à 50 mg/l. Si l'hydrosolubilité de la substance d'essai est faible ou si des effets toxiques risquent de se produire, abaisser la concentration à 5 mg/l de COD ou même moins, mais seulement si une méthode d'analyse spécifique est applicable (les substances d'essai dispersées peu solubles dans l'eau peuvent être ajoutées par le biais de techniques de dosage spéciales, voir appendice 5).

39. Une fois que le système est stabilisé et élimine le COD du milieu organique avec efficacité (environ 80 pour cent), commencer à ajouter la substance d'essai. Il est important de vérifier que toutes les unités travaillent avec le même rendement avant d'ajouter la substance d'essai; si ce n'est pas le cas, il est souvent utile de mélanger les différentes boues et de redistribuer des volumes égaux aux unités. Lorsqu'on utilise un inoculum de quelque 2,5 g/l (poids sec) de boues activées, la substance d'essai peut être ajoutée dès le début de l'essai, car l'addition directe de quantités croissantes dès le départ offre l'avantage de pouvoir rendre les boues activées mieux adaptables à la substance d'essai. Quelles que soient les modalités de l'adjonction de la substance d'essai, il est recommandé de mesurer les débits et/ou les volumes correspondants dans le(s) récipient(s) de stockage à intervalles réguliers.

Manipulation des boues activées

40. La concentration des solides des boues activées se stabilise normalement durant l'essai, quel que soit l'inoculum utilisé, entre 1 et 3 g/l (poids sec) suivant la qualité et la concentration du milieu organique, les conditions expérimentales, la nature des micro-organismes présents et l'influence de la substance d'essai.

41. Déterminer les solides en suspension dans les récipients d'aération au moins une fois par semaine en jetant les boues excédentaires, afin de maintenir la concentration entre 1 g/l et 3 g/l (poids sec), ou veiller à la constance de l'âge moyen des boues, qui doit généralement se situer entre 6 et 10 jours. Si l'on choisit, par exemple, un temps de rétention des boues de 8 jours, on enlèvera chaque jour 1/8 du volume des boues activées dans le récipient d'aération et on le jettera. Effectuer cette opération quotidiennement ou, de préférence, utiliser une pompe automatique intermittente. Le maintien de la concentration des solides en suspension à une valeur constante ou entre des limites étroites ne fige pas le temps de rétention des boues, qui est la variable permettant de déterminer la concentration de la substance d'essai dans l'effluent.

42. Tout au long de l'essai, ôter au moins une fois par jour la boue qui adhère aux parois du récipient d'aération et du décanteur et remettre cette dernière en suspension. Inspecter et nettoyer régulièrement tous les tuyaux afin de prévenir la croissance d'un biofilm. Recycler les boues décantées du décanteur en la renvoyant dans le récipient d'aération, de préférence par pompage intermittent. Le système des vases poreux ne comporte pas de recyclage, mais il faut veiller à placer des cylindres internes propres avant que le volume n'atteigne une croissance significative dans le récipient (paragraphe 21).

43. Une mauvaise décantation et des pertes de boues peuvent se produire dans les unités d'Husmann. On peut y remédier en effectuant en parallèle dans les unités d'essai et les unités témoin une ou plusieurs des opérations énumérées ci-dessous:

— ajouter des boues fraîches ou un floculant (2 ml par récipient d'une solution de $FeCl_3$ à 50 g/l, par exemple) à intervalles réguliers, par exemple hebdomadaires, en s'assurant que le $FeCl_3$ ne réagit pas avec la substance d'essai et ne la fasse pas précipiter,

▼M4

— remplacer l'émulseur à air par une pompe péristaltique, afin d'instaurer un flux de recirculation des boues à peu près égal au débit entrant à appliquer et de permettre la formation d'une zone anaérobie dans les boues décantées (la géométrie du dispositif airlift limite le débit minimum du retour des boues à environ douze fois celui des eaux à traiter),

— pomper les boues, par intermittence, du décanteur vers le récipient d'aération (par exemple pendant 5 minutes toutes les 2,5 heures afin de recycler 1 à 1,5 l/h,

— utiliser un agent antimousse non toxique à une concentration minimale pour empêcher les pertes dues à la formation de mousse (de l'huile de silicone, par exemple),

— insuffler de l'air à travers les boues dans le décanteur par puissantes saccades (par exemple pendant 10 secondes toutes les heures),

— doser le milieu organique par intervalles dans le récipient d'aération (par exemple pendant 3 à 10 minutes toutes les heures).

Échantillonnage et analyse

44. À intervalles réguliers, mesurer la concentration d'oxygène dissous, la température et le pH des boues activées dans les récipients d'aération. Faire en sorte qu'il y ait toujours suffisamment d'oxygène disponible (> 2 mg/l) et que la température demeure dans la gamme requise (normalement de 20 °C à 25 °C). Maintenir le pH à 7,5 ± 0,5 en dosant de petites quantités d'une base ou d'un acide inorganiques que l'on introduit dans le récipient d'aération ou dans les eaux à traiter, ou en augmentant le pouvoir tampon du milieu organique (voir paragraphe 27). Si une nitrification a lieu, elle génère de l'acide, l'oxydation de 1 mg d'azote produisant l'équivalent de quelque 7 mg de CO_3. La fréquence des mesures dépend du paramètre à mesurer et de la stabilité du système, et peut varier entre une cadence journalière et hebdomadaire.

45. Déterminer le COD ou la DCO dans les eaux à traiter des récipients d'essai et témoins. Mesurer la concentration de la substance d'essai dans les eaux brutes par une analyse spécifique ou estimer cette variable d'après la concentration dans la solution mère (paragraphe 31), le volume utilisé et la quantité d'eaux usées dosées dans l'unité d'essai. Il est recommandé de calculer la concentration de la substance d'essai afin de réduire la variabilité des données relatives à la concentration.

46. Prélever des échantillons appropriés dans l'effluent recueilli (par exemple des échantillons composites sur 24 heures) qui seront filtrés à travers une membrane à pores de 0,45 μm ou centrifugés à environ 40 000 m/s^2 pendant près d'un quart d'heure. Il convient de recourir à la centrifugation si la filtration pose des difficultés. Déterminer le COD ou la DCO au moins deux fois, afin de mesurer par une analyse spécifique de la substance d'essai la biodégradation finale et, selon les besoins, la biodégradation primaire.

47. L'utilisation de la DCO peut donner lieu à des problèmes analytiques aux faibles concentrations et n'est donc recommandée que si la concentration d'essai est suffisante (environ 30 mg/l). S'agissant de substances très adsorbantes, on préconise de mesurer la quantité de substance adsorbée dans les boues par une technique d'analyse spécifique de la substance d'essai.

48. La fréquence de l'échantillonnage dépend de la durée supposée de l'essai. Un rythme de trois fois par semaine est recommandé. Une fois que les unités fonctionnent de manière efficace, on leur laisse une période d'adaptation de une à six semaines maximum après l'introduction de la substance d'essai, afin de leur permettre d'atteindre un état stationnaire. Il faut, de préférence, obtenir au moins 15 valeurs valables pendant la phase plateau (paragraphe 59), qui dure normalement trois semaines, pour évaluer le résultat de l'essai. L'essai peut s'arrêter là si l'on a atteint un degré d'élimination suffisant (par exemple supérieur à 90 pour cent) et si l'on possède ces 15 valeurs issues d'analyses conduites chaque jour de semaine pendant trois semaines. L'essai ne doit normalement pas se prolonger au-delà de 12 semaines après l'addition de la substance d'essai.

▼M4

49. Si les boues sont nitrifiantes et que les effets de la substance d'essai sur la nitrification sont à étudier, analyser des échantillons prélevés dans les effluents de l'unité d'essai et de l'unité témoin, au moins une fois par semaine pour l'ammonium et/ou les nitrites et nitrates.

50. Toutes les analyses doivent être exécutées le plus vite possible, en particulier celles qui portent sur l'azote. Au cas où les analyses doivent être différées, conserver les échantillons à environ 4 °C à l'obscurité dans des bouteilles pleines et bouchées hermétiquement. S'il y a lieu de stocker les échantillons pendant plus de 48 heures, on les conservera par congélation, acidification (par exemple 10 ml/l d'une solution d'acide sulfurique à 400 g/l) ou par adjonction d'un toxique approprié [par exemple 20 ml/l d'une solution de chlorure de mercure (II) à 10 g/l]. S'assurer que la technique de conservation n'influence pas les résultats de l'analyse.

Couplage des unités d'essai

51. Si l'on effectue un couplage (appendice 3), échanger quotidiennement la même quantité de boues activées (de 150 ml à 1 500 ml pour les récipients d'aération contenant trois litres de liquide) entre les récipients d'aération de l'unité d'essai et de l'unité témoin. Si la substance d'essai s'adsorbe fortement sur les boues, n'échanger que le surnageant des décanteurs. Introduire dans les deux cas un facteur de correction dans le calcul des résultats de l'essai (paragraphe 55).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

52. Calculer le pourcentage d'élimination de la substance d'essai en termes de COD ou de DCO pour chaque évaluation programmée dans le temps à l'aide de l'équation suivante:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

où

D_t = pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO à l'instant t;

C_s = COD ou DCO dans les eaux à traiter, induits par la substance d'essai, estimés de préférence à partir de la solution mère (mg/l);

E = valeur mesurée du COD ou de la DCO dans les effluents d'essai à l'instant t (mg/l);

E_o = valeur mesurée du COD ou de la DCO dans les effluents témoins à l'instant t (mg/l).

53. Le degré d'élimination du COD ou de la DCO du milieu organique de l'unité témoin est utile pour évaluer l'activité de biodégradation des boues activées pendant l'essai. Calculer le pourcentage d'élimination selon l'équation suivante:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

où

D_B = pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO du milieu organique de l'unité témoin à l'instant t;

C_M = COD ou DCO du milieu organique des eaux brutes témoins (mg/l).

▼M4

Calculer, facultativement, le pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO engendrés par le milieu organique et la substance d'essai dans l'unité d'essai, à partir de l'équation suivante:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

où

D_T = pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO dans la totalité des eaux brutes d'essai;

C_T = COD ou DCO de la totalité des eaux brutes d'essai ou calculés à partir des solutions mères (mg/l).

54. Calculer l'élimination de la substance d'essai si elle a été mesurée par une méthode d'analyse spécifique à chaque instant d'évaluation, selon l'équation suivante:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

où

D_{ST} = pourcentage d'élimination primaire de la substance d'essai à l'instant t;

S_i = concentration mesurée ou estimée de la substance d'essai dans les eaux brutes d'essai (mg/l);

S_e = concentration mesurée de la substance d'essai dans les eaux brutes d'essai à l'instant t (mg/l).

55. En mode couplé, compenser la dilution de la substance d'essai dans le récipient d'aération, occasionnée par l'échange de boues, par un facteur de correction (voir appendice 3). Si on a appliqué un temps de rétention hydraulique moyen de six heures et échangé la moitié du volume de boues activées contenu dans le récipient d'aération, il faut corriger les valeurs déterminées de l'élimination quotidienne (D_t, paragraphe 52) afin d'obtenir le degré réel d'élimination, D_{tc}, de la substance d'essai, à partir de l'équation suivante:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Expression des résultats de l'essai

56. Tracer une courbe des pourcentages d'élimination D_t (ou D_{tc}) et D_{ST}, le cas échéant, en fonction du temps (voir appendice 2). Certaines conclusions peuvent être tirées de l'allure de la courbe d'élimination de la substance d'essai (proprement dite ou à travers le COD) sur le processus d'élimination.

Adsorption

57. Si l'on observe une élimination élevée de la substance d'essai en termes de COD dès le début de l'essai, cette substance est probablement évacuée par adsorption sur les solides des boues activées. Il est possible de prouver ce phénomène en mesurant la substance d'essai adsorbée au moyen d'une analyse spécifique. Il est rare que l'élimination du COD de substances adsorbables demeure élevée tout au long de l'essai; normalement, le degré d'élimination est élevé au départ puis décline progressivement jusqu'à une valeur d'équilibre. Si toutefois la substance d'essai était de nature à acclimater la population de micro-organismes d'une façon ou d'une autre, l'élimination du COD de la substance d'essai augmenterait pour atteindre une valeur plateau élevée.

▼M4

Phase de latence

58. Beaucoup de substances d'essai, comme cela se produit dans les essais de sélection statiques, traversent une phase de latence avant que la biodégradation n'opère à plein régime. Durant la phase de latence, les bactéries qui dégradent s'acclimatent ou s'adaptent et n'éliminent presque pas la substance d'essai, ensuite elles commencent à croître. Cette phase s'achève et la phase de dégradation est censée débuter lorsque environ 10 pour cent de la quantité initiale de la substance d'essai est éliminée (y compris par adsorption, le cas échéant). La phase de latence est souvent très variable et peu reproductible.

Phase plateau

59. Le plateau de la courbe d'élimination d'un essai conduit en continu est défini comme la phase au cours de laquelle la dégradation est maximale. La phase plateau doit durer au moins trois semaines et être déterminée par une quinzaine de valeurs mesurées valables.

Degré moyen d'élimination de la substance d'essai

60. Calculer la moyenne des valeurs d'élimination (D_t) de la substance d'essai durant la phase plateau. Arrondie au nombre entier le plus proche (1 %), elle représente le degré d'élimination de la substance d'essai. On recommande également de calculer l'intervalle de confiance à 95 % de la valeur moyenne.

Élimination du milieu organique

61. Porter sur un graphique le pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO du milieu organique dans l'unité témoin (D_B) en fonction du temps. Indiquer le degré d'élimination moyen comme pour la substance d'essai (paragraphe 60).

Indication de la biodégradation

62. Si la substance d'essai n'est pas adsorbée de façon significative sur les boues activées et que la courbe d'élimination présente le profil typique d'une courbe de biodégradation avec phase de latence, dégradation et plateau (paragraphes 58, 59), l'élimination mesurée est attribuable à coup sûr à la biodégradation. Si l'élimination est élevée au début, l'essai de simulation ne permet pas de faire la distinction entre les processus d'élimination biologiques et non biologiques. Dans ces cas-là, comme dans d'autres où la biodégradation suscite des doutes, (par exemple si on observe une séparation), analyser les substances d'essai adsorbées ou effectuer des essais de biodégradation statiques supplémentaires fondés sur des paramètres qui attestent clairement des processus biologiques. Il s'agit d'essais basés sur la consommation d'oxygène [chapitres C.4-D, E et F de la présente annexe (6)] ou sur la mesure de la production de dioxyde de carbone [chapitre C.4-C de la présente annexe (6)] ou de l'essai au CO_2 dans l'espace de tête de l'ISO (18), à conduire sur un inoculum préexposé provenant de l'essai de simulation. Si l'élimination du COD et de la substance proprement dite ont été mesurées, des différences significatives (le premier étant inférieur à la seconde) entre les pourcentages indiquent que les effluents renferment des produits organiques intermédiaires susceptibles d'être plus difficiles à dégrader que la substance parente.

Validité des résultats de l'essai

63. L'obtention d'informations sur l'activité de biodégradation normale de l'inoculum est subordonnée à la détermination du degré d'élimination du milieu organique (paragraphe 53) dans l'unité témoin. L'essai est considéré comme valable si le degré d'élimination du COD ou de la DCO dans la ou les unités témoins est supérieur à 80 pour cent après deux semaines et qu'aucun phénomène inhabituel n'a été observé.

▼M4

64. Si on a utilisé une substance de référence immédiatement biodégradable, le degré de biodégradation (D_t, paragraphe 52) doit être supérieur à 90 pour cent.

65. Si l'essai est mené dans des conditions nitrifiantes, la concentration moyenne dans les effluents doit être < 1 mg/l d'azote ammoniacal et < 2 mg/l d'azote sous forme de nitrites.

66. Faute de remplir ces critères (paragraphes 63-65), recommencer l'essai en prélevant l'inoculum à une source différente, mettre une substance de référence à l'essai et réexaminer tout le mode opératoire.

Rapport d'essai

67. Le rapport d'essai doit inclure les informations suivantes:

Substance d'essai:

— nature chimique,

— état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques.

Conditions d'essai:

— type de système d'essai; toute modification imposée par l'essai de substances insolubles et volatiles,

— type de milieu organique,

— proportion et nature des effluents industriels dans les eaux usées, s'ils sont connus,

— inoculum, nature et site(s) de prélèvement, concentration et prétraitement éventuel,

— solution mère de la substance d'essai: teneur en COD et en COT; mode de préparation, s'il s'agit d'une suspension; concentration d'essai appliquée; justifier pourquoi, le cas échéant, on s'écarte de l'intervalle 10 à 20 mg/l de COD; méthode d'addition; date de la première addition; toute modification,

— âge moyen des boues et temps de rétention hydraulique moyen; méthode d'épuisement des boues; méthodes pour vaincre le foisonnement, pertes de boue, etc.,

— techniques d'analyse employées,

— température d'essai,

— qualités du foisonnement des boues, indice des boues, matières en suspension de la liqueur mixte,

— tout écart du mode opératoire normal et toute circonstance susceptibles d'avoir affecté les résultats.

Résultats de l'essai:

— toutes les données mesurées (COD, DCO, analyses spécifiques, pH, température, concentration d'oxygène, solides en suspension, substances azotées, le cas échéant),

— toutes les valeurs calculées de D_t (ou D_{tc}), D_B, D_{St} présentées sous forme de tableau et de courbes d'élimination,

— informations sur les phases de latence et de plateau, durée de l'essai, degré d'élimination de la substance d'essai et du milieu organique dans l'unité témoin, données statistiques, conclusions sur la biodégradabilité et validité de l'essai,

— examen des résultats.

▼**M4**

BIBLIOGRAPHIE:

(1) Swisher R.D. (1987). «Surfactant Biodegradation», 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1 085 pp.

(2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698-706.

(3) Painter H.A. and King E.F. (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.

(4) Painter H.A. and King E.F. (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909-915.

(5) Eckenfelder, W.W. (19) US EPA.

(6) Chapitre C.4 de la présente annexe, Détermination de la biodégradabilité «facile».

(7) Chapitre C.12 de la présente annexe, Biodégradation – Test S.C.A.S. modifié.

(8) Chapitre C.19 de la présente annexe, Estimation du coefficient d'adsorption (K_{OC}) sur le sol et les boues d'épuration par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

(9) Gerike P. and Fischer W.K. (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157-173.

(10) Gerike P. and Fischer W.K. (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.

(11) Painter H.A. and Bealing D. (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(12) ISO 11733 (1995; révision 2004). Détermination de l'élimination et de la biodégradabilité des composés organiques en milieu aqueux – Essai de simulation des boues activées.

(13) Birch R.R. (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33-48.

(14) Birch R.R. (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.

(15) Gerike P., Fischer W.K. and Holtmann W. (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753-758.

(16) Baumann U., Kuhn G. and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(17) Her Majesty's Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. pp. 91-98 ISBN 011 751661 9.

(18) ISO 14593 (1998). Qualité de l'eau – Évaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie ultime des composés organiques – Méthode par analyse du carbone inorganique dans des récipients hermétiquement clos (Essai au CO_2 dans l'espace de tête).

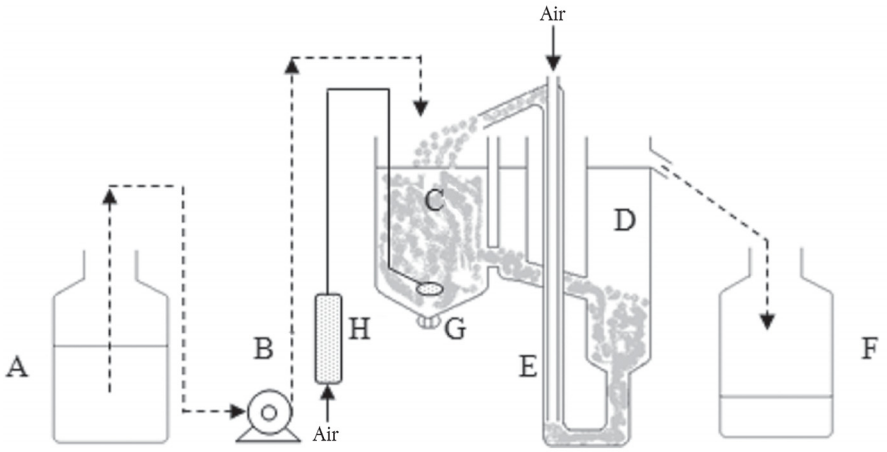
▼**M4**

Appendice 1

Figure 1

Matériel utilisé pour évaluer la biodégradabilité

Unité d'Husmann



A. Récipient de stockage

B. Pompe doseuse

C. Récipient d'aération (3 litres)

D. Décanteur

E. Émulseur à air

F. Collecteur

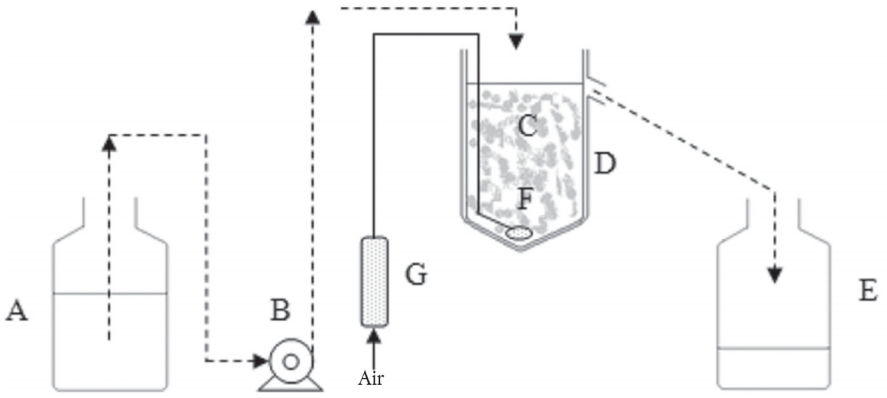
G. Cuve d'aération

H. Débitmètre d'air

Figure 2

Matériel utilisé pour évaluer la biodégradabilité

Vase poreux



A. Récipient de stockage

B. Pompe doseuse

C. Vase d'aération poreux

D. Enveloppe imperméable

E. Collecteur

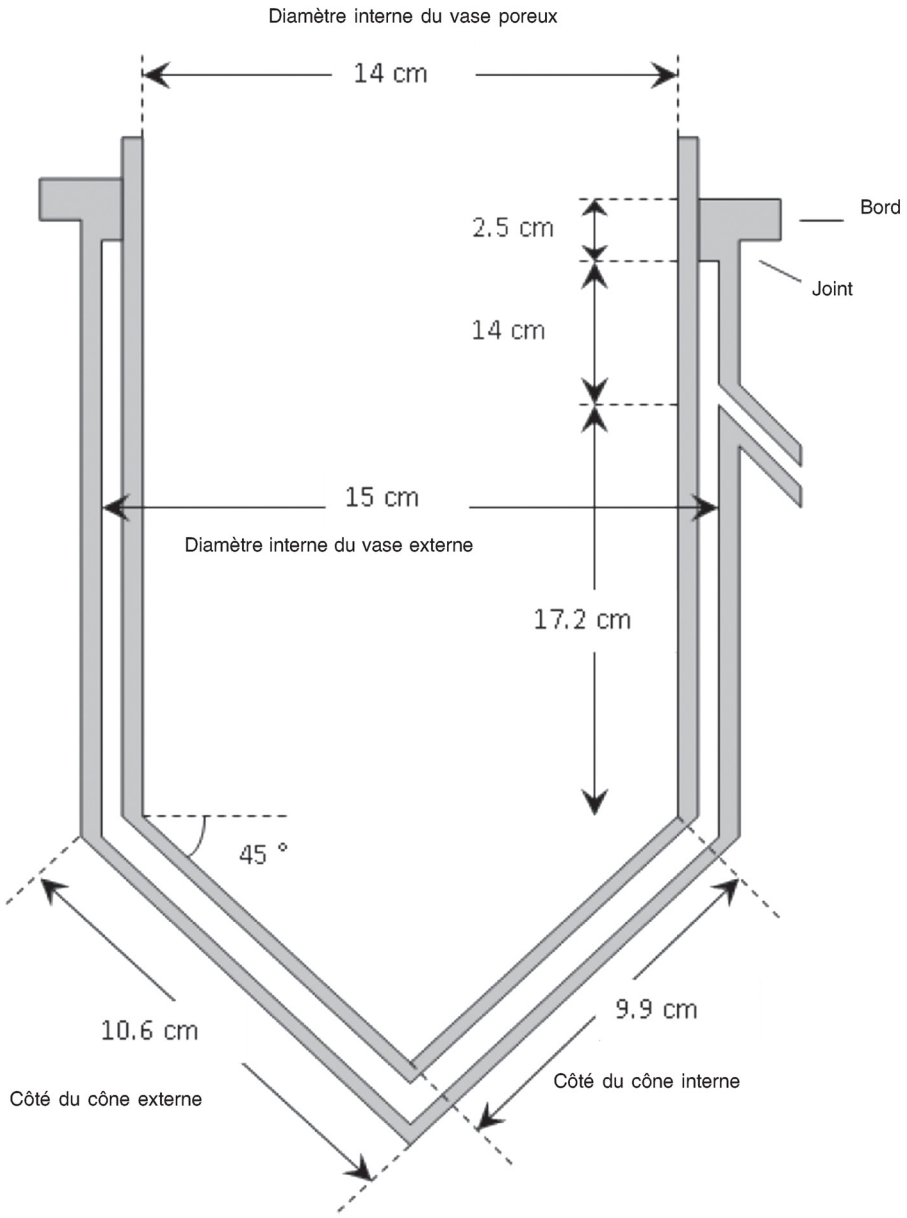
F. Diffuseur

G. Débitmètre d'air

▼**M4**

Figure 3

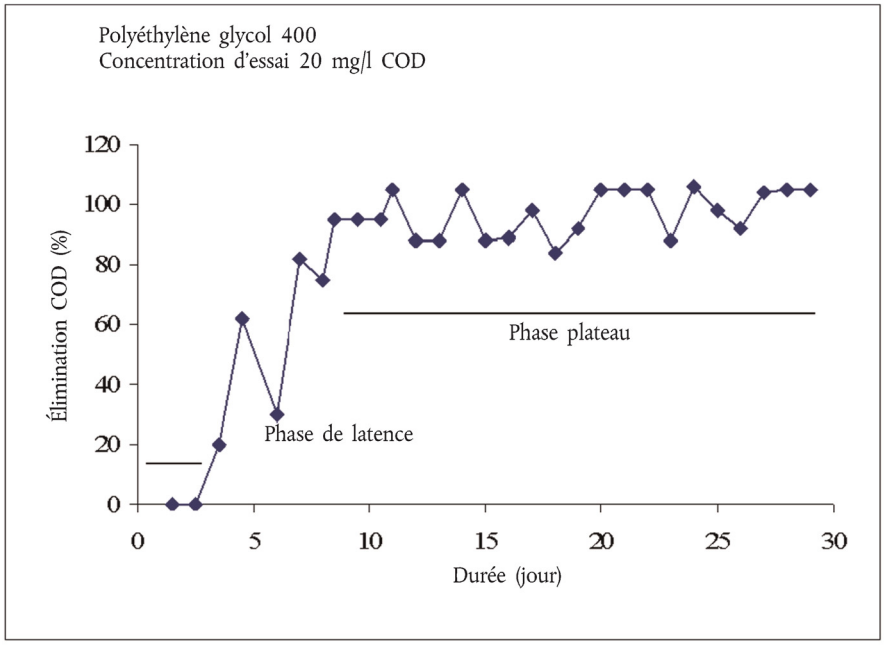
Agrandissement du vase d'aération poreux de 3 litres



▼**M4**

Appendice 2

Exemple d'une courbe d'élimination



▼M4

Appendice 3

COMPLÉMENT D'INFORMATION

COUPLAGE DES UNITÉS D'ESSAI

Pour tenter d'égaliser les populations de micro-organismes dans les boues de l'unité d'essai, qui reçoit les eaux usées et une substance d'essai, et de l'unité témoin, qui ne reçoit que les eaux usées, on a instauré un échange de boue quotidien entre ces deux unités (1). Ce procédé dit «de couplage» a donné lieu à la méthode des unités couplées. Le couplage, réalisé au départ sur des unités à boues activées de Husmann, a aussi été appliqué à des unités à vase poreux (2) (3). Les résultats obtenus avec les unités couplées et non couplées, qu'il s'agisse des unités d'Husmann ou des unités à vase poreux, ne donnent lieu à aucune différence significative, si bien qu'il n'y a aucun avantage à investir plus de temps et d'énergie dans le couplage.

Les échanges de boue peuvent laisser croire à une élimination assez considérable, puisqu'une partie de la substance d'essai est transférée et que l'écart entre la concentration de la substance d'essai dans les effluents d'essai et dans les effluents témoins se comble. Il faut donc appliquer des facteurs de correction qui dépendent de la fraction échangée et du temps de rétention hydraulique moyen. Une méthode de calcul plus détaillée a été publiée (1).

Calculer le degré d'élimination corrigé du COD ou de la DCO selon la formule générale suivante:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

où

D_{tc} = pourcentage d'élimination corrigé du COD ou de la DCO;

D_t = pourcentage d'élimination déterminé du COD ou de la DCO;

a = fraction volumique échangée entre les unités à boues activées;

r = temps de rétention hydraulique moyen (h)

Si, par exemple, la moitié du volume du récipient d'aération est échangée (a = 0,5) et que le temps de rétention hydraulique moyen est de 6 h, la formule de correction devient:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

BIBLIOGRAPHIE:

(1) Fischer W., Gerike P., Holtmann W. (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131-1135.

(2) Painter H.A., Bealing D.J. (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pp. 113-138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen B.N., Muntau H., Angeletti G.

(3) Painter H.A., King E.F. (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

Appendice 4

ÉVALUATION DE L'INHIBITION DES BOUES ACTIVÉES

Inhibition par les substances d'essai

1. Il se peut qu'une substance chimique (ou des eaux usées) ne soient ni dégradées ni éliminées au cours de l'essai de simulation et qu'elles inhibent de surcroît les micro-organismes des boues. D'autres composés chimiques sont biodégradés à faible concentration, mais ont une action inhibitrice à des concentrations supérieures (hormèse). Les effets inhibiteurs peuvent avoir été révélés à un stade précédent ou être déterminés par un essai de toxicité, conduit sur un inoculum semblable ou identique à celui utilisé au cours de l'essai de simulation (1). Ces méthodes ont trait à l'inhibition de la fixation d'oxygène [chapitre C.11 de la présente annexe (2) et norme ISO 8192 (3)] ou à l'inhibition de la croissance des organismes des boues [norme ISO 15522 (4)].

2. Une inhibition survenant au cours d'un essai de simulation se manifestera par une différence de COD ou de DCO entre les effluents du récipient d'essai et ceux du récipient témoin supérieure au COD ajouté par la substance d'essai. En d'autres termes, la présence de la substance d'essai abaissera le pourcentage d'élimination du COD (et de la demande biochimique en oxygène DBO, de la demande chimique en oxygène DCO, et/ou de l'ion NH^{+}_{4}) du milieu organique traité. Si cela se produit, il faudrait recommencer l'essai en ramenant la concentration de la substance d'essai jusqu'à un niveau où elle n'est pas inhibitrice et éventuellement aussi en diminuant davantage sa concentration jusqu'à une valeur où elle est biodégradée. Néanmoins, si la substance d'essai (ou les eaux usées) altèrent le processus à toutes les concentrations testées, il est vraisemblable que la substance est difficile, voire impossible, à traiter par voie biologique, mais il peut être pertinent de répéter l'essai avec des boues activées prélevées à une autre source et/ou en soumettant les boues à une acclimatation plus progressive.

3. Par contre, si la substance d'essai est éliminée par voie biologique du premier coup dans l'essai de simulation, il convient d'accroître sa concentration si l'on cherche à savoir si elle a un pouvoir inhibiteur.

4. N'oublions pas, lorsqu'on tente de déterminer les degrés d'inhibition, que la population d'une boue activée est susceptible d'évoluer, si bien qu'avec le temps, les micro-organismes peuvent devenir résistants vis-à-vis d'une substance inhibitrice.

5. Calcul du degré d'inhibition:

   Les pourcentages d'élimination globaux R_o de la DBO, du COD, de la DCO, etc., dans les unités d'essai et témoins peuvent être calculés comme suit:

$$R_o = 100\ (I - E)/I\%$$

   où:

   I = concentration de la DBO, du COD, de la DCO etc., dans les eaux à traiter des récipients d'essai ou témoins (mg/l);

   E = concentrations respectives dans les effluents (mg/l).

   I et E doivent être corrigés pour tenir compte du COD provenant de la substance d'essai dans les unités d'essai, sinon le calcul du pourcentage d'inhibition sera incorrect.

▼**M4**

Le degré d'inhibition découlant de la présence de la substance d'essai peut être calculé selon cette formule:

$$\% \text{ d'inhibition} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

où:

R_c = pourcentage d'élimination dans les récipients témoins;

R_t = pourcentage d'élimination dans les récipients d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) Reynolds L. *et al*. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.

(2) Chapitre C.11 de la présente annexe, Biodégradation – boues activées: essai d'inhibition de la respiration.

(3) ISO 8192 (2007) Qualité de l'eau – Essai d'inhibition de la consommation d'oxygène par des boues activées pour l'oxydation du carbone et de l'ammonium.

(4) ISO 15522 (1999) Détermination de l'effet inhibiteur des constituants de l'eau sur la croissance des micro-organismes de boues activées.

▼M4

Appendice 5

Substances d'essai peu solubles dans l'eau – substances volatiles

Substances peu solubles dans l'eau

Il semble qu'il y ait peu de publications rapportant des essais de simulation de traitement des eaux usées conduits sur des substances peu solubles dans l'eau et insolubles (1) (2) (3).

Il n'existe pas de méthode de dispersion universelle applicable à toutes les substances d'essai insolubles. Sur les quatre catégories de méthodes décrites dans la norme ISO 10634 (4), les deux qui paraissent convenir à la dispersion des substances destinées à un essai de simulation font appel à des agents émulsifiants et/ou à des ultrasons. La stabilité de la dispersion obtenue doit être établie pour une période d'au moins 24 heures. Des dispersions convenablement stabilisées contenues dans des réservoirs agités en permanence (paragraphe 38), seront ensuite dosées dans le récipient d'aération séparément des eaux usées domestiques ou synthétiques.

Si les dispersions sont stables, étudier comment déterminer la substance d'essai sous sa forme dispersée. Comme le COD risque fort d'être inapproprié, il faudrait mettre au point une méthode d'analyse spécifique de la substance d'essai applicable aux effluents, aux solides des effluents et à la boue activée. Le devenir de la substance d'essai dans la simulation du traitement par boues activées serait alors déterminé dans les phases solides et liquides. On établirait ainsi un bilan massique pour savoir si la substance d'essai a été biodégradée. Mais ce dernier n'indique que la biodégradation primaire. Il faudrait tâcher de démontrer la biodégradation finale par le biais d'un essai de biodégradabilité immédiate au respiromètre [chapitre C.4 de la présente annexe (5), C, F ou D] en utilisant comme inoculum une boue exposée à la substance d'essai au cours de l'essai de simulation.

Substances volatiles

L'application d'un essai de simulation du traitement des eaux usées aux substances volatiles est discutable et problématique. Comme pour les substances d'essai peu solubles dans l'eau, les rapports décrivant des essais de simulation sur des substances volatiles semblent très rares. On adapte un appareil classique de mélange intégral en bouchant hermétiquement le récipient d'aération et le décanteur, en mesurant et contrôlant le flux d'air par des débitmètres et en faisant passer les gaz sortants par des pièges afin de recueillir les matières organiques volatiles. Dans certains cas, une pompe à vide dirige les gaz sortants vers un piège froid ou un piège purgeur contenant du Tenax ou un gel de silice pour analyse par chromatographie en phase gazeuse. La substance d'essai retenue par le piège peut être déterminée par analyse.

L'essai est réalisé en deux parties. Les unités fonctionnent d'abord sans boue, mais en pompant les eaux usées synthétiques additionnées de la substance d'essai dans le récipient d'aération. On analyse la substance d'essai dans des échantillons d'eaux à traiter, d'effluents et de gaz sortants pendant quelques jours. À partir des données recueillies, il est possible de calculer le pourcentage (R_{vs}) de substance d'essai extraite du système.

Ensuite l'essai biologique normal (avec boue) est mené dans des conditions expérimentales identiques à celles de l'étude d'extraction. On mesure aussi le COD ou la DCO pour s'assurer que les unités fonctionnement efficacement. La substance d'essai est mesurée de temps à autre dans les eaux à traiter, les effluents et les gaz sortants au cours de la première partie de l'essai, et plus fréquemment après l'acclimatation. Les données tirées de la phase stationnaire permettent à nouveau de calculer le pourcentage d'élimination de la substance d'essai dans la phase liquide par les processus physiques et biologiques (R_T) ainsi que la proportion (R_v) extraite du système.

▼M4

Calcul:

a) Dans l'essai non biologique, le pourcentage (R_{VP}) de substance d'essai extraite du système peut être calculé à partir de la formule suivante:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

où

R_{VP} = élimination de la substance d'essai par volatilisation (%),

S_{VP} = substance d'essai collectée par le piège, exprimée en équivalent de concentration dans la phase liquide (mg/l),

S_{IP} = concentration de la substance d'essai dans les eaux à traiter (mg/l).

b) Dans l'essai biologique, le pourcentage (R_V) de la substance d'essai extraite du système peut être calculé à partir de la formule suivante:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

où

R_V = élimination de la substance d'essai par volatilisation au cours de l'essai biologique (%),

S_V = substance d'essai collectée par le piège au cours de l'essai biologique, exprimée en équivalent de concentration dans les flux liquides entrants (mg/l),

S_I = concentration de la substance d'essai dans les eaux brutes (mg/l).

c) Dans l'essai biologique, le pourcentage (R_T) de substance d'essai éliminée par tous les processus est régi par l'équation suivante:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

où

S_E = concentration de la substance d'essai dans les effluents (liquides) (mg/l).

d) Aussi, le pourcentage (R_{BA}) enlevé par biodégradation et par adsorption peut-il être calculé comme suit:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Il conviendrait de réaliser d'autres essais pour déterminer si la substance d'essai est adsorbée, auquel cas une correction supplémentaire pourrait être apportée.

e) Une comparaison entre la proportion de substance d'essai extraite lors de l'essai biologique (R_v) et de l'essai non biologique (R_{vp}) montre l'effet global du traitement biologique sur l'émission de la substance d'essai dans l'atmosphère.

Exemple: Benzène

Temps de rétention des boues = 4 jours

Eaux usées synthétiques: temps de rétention = 8 heures

$S_{IP} = S_I = 150$ mg/l

$S_{VP} = 150$ mg/l ($S_{EP} = 0$)

$S_V = 22{,}5$ mg/l

$S_E = 50$ µg/l

▼**M4**

Donc,

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % and R_{BA} = 85 %.

On a supposé qu'il n'y avait pas adsorption du benzène sur la boue.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) Horn J.A., Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.

(2) Pitter P., Chudoba J. (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

(3) Stover E.L., Kincannon D.F. (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

(4) ISO 10634 (1995) Qualité de l'eau – Lignes directrices pour la préparation et le traitement des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux.

(5) Chapitre C.4 de la présente annexe, Détermination de la biodégradabilité «facile».

▼M4

Appendice 6

Effets du temps de rétention des boues (TRB) sur les possibilités de traitement des substances chimiques

INTRODUCTION

1. La méthode décrite dans le corps de texte a été conçue pour vérifier si les substances chimiques testées (généralement celles connues comme étant intrinsèquement, mais pas immédiatement biodégradables) pouvaient être biodégradées dans les limites imposées par les stations d'épuration des eaux usées. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'élimination et de biodégradation. Les conditions de fonctionnement des unités à boues activées et le choix des eaux à traiter autorisent une variation assez marquée de la concentration de la substance d'essai dans les effluents. Les essais ne portent que sur une seule concentration nominale de solides des boues ou sur un seul temps de rétention nominal des boues (TRB), et les régimes d'épuisement des boues décrits sont susceptibles de faire varier considérablement le TRB durant l'essai, d'un jour à l'autre et sur une journée.

2. Dans cette variante (1) (2), le TRB est régulé dans des limites beaucoup plus étroites tout au long de chaque période de 24 heures (comme à grande échelle), si bien que la concentration des effluents est plus constante. On recommande les eaux usées domestiques, qui donnent des pourcentages d'élimination plus réguliers et plus élevés. Les effets de plusieurs valeurs du TRB sont aussi examinés et l'incidence d'une gamme de températures sur la concentration dans les effluents peut être déterminée dans une étude plus détaillée.

3. Il n'existe pas encore de consensus général sur les modèles cinétiques qui reproduisent la biodégradation des substances chimiques dans les conditions d'une station de traitement des eaux usées. S'agissant des données collectées, le modèle de croissance bactérienne et d'utilisation du substrat de Monod a été choisi (1) (2) dans la mesure où la méthode était destinée à ne s'appliquer qu'aux substances chimiques produites par tonnes et donc présentes à des concentrations supérieures à 1 mg/l dans les eaux usées. La validité du modèle simplifié et des hypothèses émises a été établie à l'aide d'une série d'alcooléthoxylates (2) (3) manifestant des degrés variables de biodégradabilité primaire.

Note: cette variante reprend en grande partie le texte de la présente méthode d'essai C.10-A, seuls les détails qui s'en écartent étant mentionnés ci-après.

PRINCIPE DE L'ESSAI

4. Des unités à boues activées comportant un vase poreux, conçues pour faciliter l'épuisement (presque) continu de la liqueur mixte grâce à un réglage très précis du temps de rétention des boues (TRB, ou θ_s), fonctionnent en mode non couplé et couvrent une gamme de temps de rétention et, facultativement, de températures. Le temps de rétention varie généralement entre 2 et 10 jours et la température entre 5 et 20 °C. Les eaux usées, de préférence domestiques, et une solution de la substance d'essai sont dosées séparément dans les unités à des fréquences induisant le temps de rétention des eaux usées requis (3 à 6 heures) et la concentration voulue de la substance d'essai dans les eaux à traiter. Les unités témoins qui ne reçoivent pas la substance d'essai tournent en parallèle, à des fins de comparaison.

5. D'autres types d'appareils peuvent être utilisés, mais il faut être très attentif à bien maîtriser le TRB. Lorsqu'on utilise, par exemple, des installations qui comprennent un décanteur, il peut être nécessaire de tenir compte de la perte de solides via les effluents de l'installation. En outre, les erreurs dues à la variation de la quantité de boue dans le décanteur doivent être évitées par des précautions particulières.

▼M4

6. Les unités fonctionnent sous chaque combinaison de conditions choisie et, une fois l'équilibre atteint, on mesure les concentrations moyennes de la substance d'essai dans les effluents à l'état stationnaire et, facultativement, le COD, sur une période d'environ trois semaines. L'évaluation du pourcentage d'élimination de la substance d'essai et, facultativement, du COD, sera complétée par une représentation graphique de la relation entre les conditions de fonctionnement de l'installation et la concentration dans les effluents. À partir de là, il est possible de calculer des constantes cinétiques expérimentales et de prévoir les conditions dans lesquelles la substance d'essai peut être traitée.

INFORMATION SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

7. Appliquer les paragraphes 12 et 13 du chapitre C.10-A.

NIVEAUX DE SEUILS

8. Appliquer les paragraphes 14 et 15 du chapitre C.10-A.

SUBSTANCE D'ESSAI DE RÉFÉRENCE

9. Appliquer le paragraphe 16 du chapitre C.10-A.

REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS D'ESSAI

10. Appliquer les paragraphes 17 et 18 du chapitre C.10-A.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareils

11. Une unité qui convient ici est une adaptation du système du vase poreux (appendice 6.1). Elle consiste en un vase interne (ou revêtement) en polypropylène poreux de 3,2 mm d'épaisseur dont les pores mesurent environ 90 μm; l'assemblage est soudé bout à bout, ce qui rend l'unité plus robuste que celle décrite au paragraphe 21 du présent chapitre, C.10-A). Le revêtement est entouré d'une enveloppe en polyéthylène imperméable qui comprend deux parties: une base circulaire perforée pour laisser passer deux tuyaux à air et un tuyau transportant la boue épuisée, et un cylindre vissé sur le dessus de la base et doté d'une sortie placée de manière à ce qu'il déverse un volume connu (3 l) dans le vase poreux. L'un des deux tuyaux à air est équipé d'une pierre diffuseuse et l'autre est ouvert aux extrémités et disposé à angle droit de la pierre dans le vase. Ce système crée suffisamment de turbulences pour assurer un mélange intégral des composants du vase et engendrer des concentrations en oxygène dissous supérieures à 2 mg/l.

12. Les unités, en nombre adéquat, sont placées dans un bain-marie ou dans des locaux à température constante et thermostatées entre 5 et 20 °C (± 1 °C). On emploie deux pompes pour doser la solution de la substance d'essai et les boues décantées dans les récipients d'aération aux débits requis (respectivement 0-1,0 ml/min et 0-25 ml/min) et une troisième pompe pour évacuer la boue épuisée des récipients d'aération. Le débit nécessairement très lent des boues épuisées est imprimé par une pompe qui fonctionne à une vitesse supérieure et par intermittences, au moyen d'un minuteur qui l'actionne, par exemple, pendant 10 secondes par minute avec un débit de 3 ml/min, ce qui donne un débit de boue épuisée de 0,5 ml/min.

Appareil de filtration ou centrifugeuse

13. Appliquer le paragraphe 23 du chapitre C10-A.

Matériel d'analyse

14. Appliquer le paragraphe 24 du chapitre C.10-A.

Eau

▼**M4**

15. Appliquer les paragraphes 25 et 26 du chapitre C.10-A.

Milieu organique

16. Appliquer le paragraphe 27 du chapitre C.10-A.

Eaux usées synthétiques

17. Appliquer le paragraphe 28 du chapitre C.10-A.

Eaux usées domestiques

18. Appliquer le paragraphe 29 du chapitre C.10-A.

Boues activées

19. Appliquer le paragraphe 30 du chapitre C10-A.

Solutions mères de la substance d'essai

20. Appliquer les paragraphes 31 et 32 du chapitre C.10-A.

MODE OPÉRATOIRE

Préparation de l'inoculum

21. Voir chapitre C.10-A, paragraphe 34 uniquement – utiliser des boues activées (environ 2,5 g/l).

Nombre d'unités d'essai

22. S'agissant d'un essai simple, qui ne vise qu'à mesurer le pourcentage d'élimination, un seul TRB suffit, mais si on veut réunir les données nécessaires pour calculer les constantes cinétiques expérimentales, on aura besoin de 4 ou 5 valeurs de TRB. Les valeurs choisies sont généralement comprises entre 2 et 10 jours. Il est plus pratique de réaliser un essai en appliquant 4 ou 5 valeurs de TRB simultanément à la même température; les études plus poussées portent sur les mêmes valeurs de TRB, ou éventuellement sur une gamme de valeurs différentes, à d'autres températures fixées entre 5 et 20 °C. La biodégradation primaire (utilisation principale) ne requiert normalement qu'une seule unité par combinaison de conditions. Il faut ajouter une unité témoin par combinaison de conditions, qui reçoit les eaux usées mais pas la substance d'essai, pour la biodégradation finale. Si on suppose que les eaux usées employées renferment la substance d'essai, il y a lieu d'incorporer des unités témoins lorsqu'on évalue la biodégradation primaire, et d'apporter les corrections nécessaires aux calculs.

Dosage du milieu organique et de la substance d'essai

23. Voir le chapitre C.10-A, paragraphes 36 à 39, mais remarquer que la solution de la substance d'essai est dosée séparément et différents débits de boues épuisées sont appliqués. Surveiller fréquemment, par exemple deux fois par jour et ajuster si nécessaire à ± 10 pour cent, les débits des eaux à traiter, des effluents et des boues épuisées. Si les méthodes d'analyse posent des difficultés avec les eaux usées domestiques, mener l'essai avec de l'eau usée synthétique, en s'assurant que différents milieux donnent des résultats cinétiques comparables.

Manipulation des boues activées

24. S'aligner sur le chapitre C.10-A, paragraphes 40 à 43, mais ne réguler le TRB que par un débit «constant» de boues épuisées.

Échantillonnage et analyse

25. Se référer au chapitre C.10-A, paragraphes 44 à 50, à cette exception près qu'on déterminera la concentration de la substance d'essai et, facultativement, le COD, mais la DOC ne doit pas être utilisée.

▼M4

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

26. Suivre le chapitre C.10-A, paragraphes 52 à 54.

Expression des résultats de l'essai

27. Suivre le chapitre C.10-A, paragraphes 56 à 62.

Calcul des constantes cinétiques

28. Il est plus réaliste de mentionner la concentration moyenne de la substance d'essai à l'état stationnaire dans l'effluent et de décrire comment elle varie en fonction des conditions de fonctionnement de l'installation que de citer le pourcentage de biodégradation primaire. L'équation [6] de l'appendice 6.2 est utile à cet égard, qui livre des valeurs de K_S, μ_m et θ_{SC}, le temps de rétention critique des boues.

[Des valeurs approximatives de K_S et de μm peuvent aussi être déduites à l'aide d'un programme informatique simple qui ajuste la courbe théorique calculée à partir de l'équation [2] (appendice 6.2) aux valeurs expérimentales. Bien qu'une solution donnée ne constitue pas une réponse absolue, on peut parvenir à une approximation raisonnable de K_S et de μ_m].

Variabilité des résultats

29. Il est fréquent de trouver des paramètres cinétiques variables pour une même substance. On pense que les conditions de croissance des boues et les conditions dans lesquelles s'est déroulé l'essai (comme au paragraphe 5 et dans d'autres essais) ont une incidence marquée sur les résultats. Un aspect de cette variabilité a été examiné par Grady *et al.* (4), qui ont proposé que les termes «effectif» et «intrinsèque» s'appliquent à deux états extrêmes représentant les limites de l'état physiologique qu'une culture peut atteindre au cours d'une expérience cinétique. Si l'état est maintenu durant l'essai, les valeurs du paramètre cinétique reflètent les conditions du milieu dans lequel les micro-organismes ont été prélevés; ces valeurs sont dites «effectives». À l'autre extrême, si les conditions de l'essai autorisent le plein développement du système de synthèse des protéines et donc un taux de croissance maximum, les paramètres cinétiques résultants sont dits «intrinsèques» et ne dépendent que de la nature du substrat et des types de bactéries qui composent la culture. À titre indicatif, on obtiendra des valeurs effectives en appliquant un rapport de la concentration du substrat sur les micro-organismes qui dégradent (S_o/X_o) faible, par exemple de 0,025, et les valeurs intrinsèques apparaîtront avec un rapport élevé, par exemple d'au moins 20. Dans les deux cas, S_o doit être supérieur ou égal à la valeur applicable de Ks, la constante de demi-saturation.

30. La variabilité et d'autres aspects de la cinétique de biodégradation ont été examinés lors d'une réunion récente du SETAC (5). Qu'elles aient fait l'objet de publications ou qu'il s'agisse de projets, ces études devraient bientôt livrer une image plus claire de la cinétique qui gouverne le traitement des eaux usées dans les stations et permettre ainsi de mieux interpréter les données existantes et d'avancer des conceptions plus pertinentes concernant de futures méthodes d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) Birch R.R. (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33-48.

(2) Birch R.R. (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. JAOCS, 61(2): 340-343.

(3) Birch R.R. (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411-422.

▼**M4**

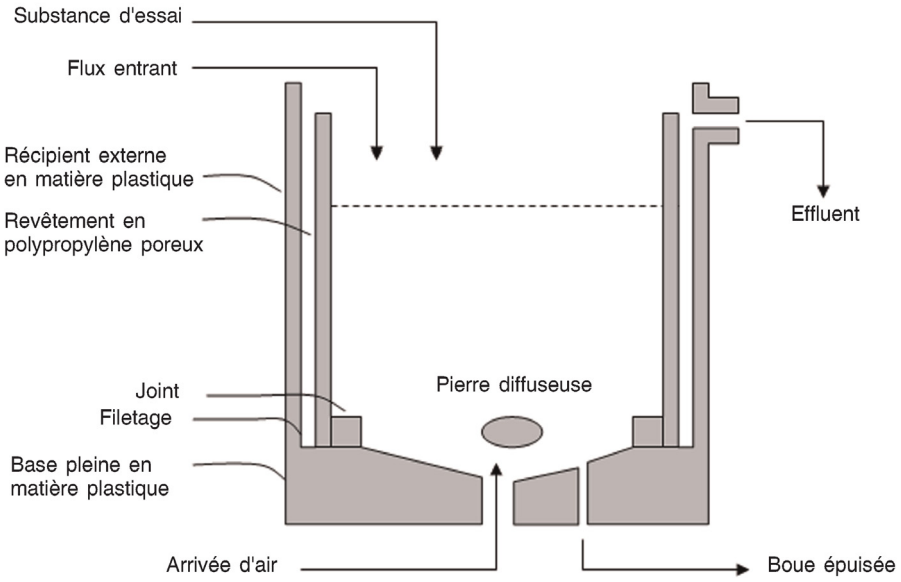
(4) Grady C.P.L., Smets B.F. and Barbeau D.S. (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742-748.

(5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales S.G., Feitjel T., King H., Fox K., Verstraete W. 4-6th September 1996. SETAC – Europe, Brussels.

▼**M4**

Appendice 6.1

Vase poreux avec régulation du TRB



▼M4

Appendice 6.2

Calcul des constantes cinétiques

1. En supposant que la cinétique de Monod s'applique et compte tenu d'un bilan massique de solides actifs et de substrat dans le système à boues activées (1), les expressions suivantes décrivent l'état stationnaire:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

ou

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

Où:

S_1 = concentration de substrat dans les effluents (mg/l)

K_S = constante de demi-saturation, concentration à laquelle $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = taux de croissance spécifique (d^{-1})

μ_m = valeur maximale de μ_m (d^{-1})

K_d = vitesse de dégradation spécifique des solides actifs (d^{-1})

θ_S = temps de rétention moyen des boues, TRB (d)

L'étude de cette équation amène les conclusions suivantes:

i) La concentration dans les effluents est indépendante de celle qui règne dans les eaux à traiter (S_0); aussi, le pourcentage de biodégradation varie-t-il avec la concentration dans les eaux à traiter, S_0.

ii) Le seul paramètre régulé de l'installation qui affecte S_1 est le temps de rétention des boues, θ_S.

iii) Une concentration donnée dans les eaux à traiter, S_0, correspondra à un temps de rétention critique des boues selon la relation:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

Où:

θ_{SC} = temps de rétention critique des boues, en dessous duquel les micro-organismes qui dégradent seront expulsés de l'installation.

iv) Comme les autres paramètres de l'équation [2] sont liés à la cinétique de croissance, la température est susceptible d'affecter la teneur en substrat dans les effluents et l'âge critique des boues, en d'autres termes, le temps de rétention des boues nécessaire pour obtenir un certain degré de traitement augmenterait à mesure que la température diminuerait.

2. Soit un bilan massique de solides dans le système à vase poreux, et en supposant que la concentration des solides dans les effluents de la station, X_2, est faible comparée à celle du récipient d'aération, X_1, le temps de rétention des boues s'exprime comme suit:

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼**M4**

et

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

où:

V = volume du récipient d'aération (l)

X_1 = concentration des solides dans le récipient d'aération (mg/l)

X_2 = concentration des solides dans l'effluent (mg/l)

Q_0 = débit des eaux à traiter (l/d)

Q_1 = débit des boues épuisées (l/d)

Il est donc possible de régler le temps de rétention des boues sur n'importe quelle valeur présélectionnée en régulant le débit des boues épuisées, Q_1.

Conclusions:

3. Cet essai vise principalement à permettre de prédire la concentration dans les effluents et, à partir de là, la concentration de la substance d'essai dans les eaux réceptrices.

4. La courbe de S_1 en fonction de θ_S autorise parfois une évaluation immédiate du temps de rétention critique des boues, θ_{SC}; voir par exemple la courbe 3 à la figure 1. Si c'est impossible, on peut calculer θ_{SC} en même temps que des valeurs approximatives de μ_m et K_S, en traçant S_1 en fonction de $S_1 \bullet \theta_S$.

L'équation [1] est reformulée en ces termes:

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Si K_d est petit, alors $1 + \theta_s \bullet K_d \sim 1$ et [5] devient:

$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Par la suite, la courbe devrait prendre l'allure d'une droite (voir figure 2) de pente $1/\mu_m$ et intercepter K_S/μ_m; et $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

Figure 1

Trois températures; cinq TRB

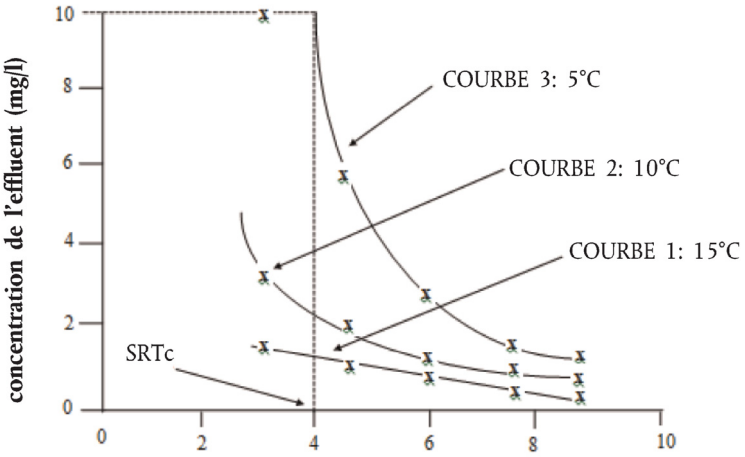
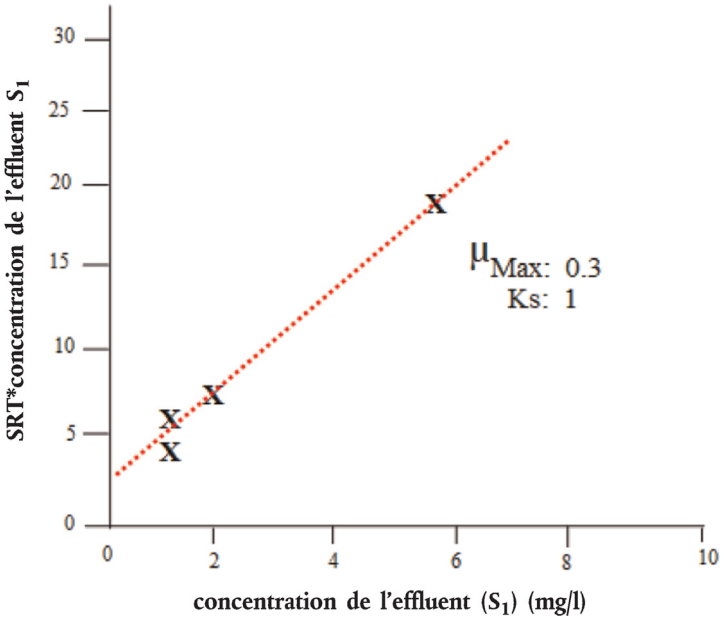


Figure 2

Droite de régression TRB · S_1 en fonction de S_1 à T = 5 °C



Glossaire

concentration de l'effluent.

courbe.

▼M4

Appendice 7

ESSAIS RÉALISÉS À FAIBLES CONCENTRATIONS (µG/L)

1. De nombreuses substances chimiques sont normalement présentes dans le milieu aquatique, même dans les eaux usées, à de très faibles concentrations (µg/l). À de telles teneurs, elles ne servent probablement pas de substrats primaires pour la croissance, et il est plus vraisemblable qu'elles subissent une dégradation en tant que substrats secondaires sans intervenir dans la croissance, parallèlement à diverses substances chimiques carbonées naturelles. Par conséquent, les dégradations de ces substances chimiques ne correspondront pas au modèle décrit à l'appendice 6. De nombreux modèles pourraient les représenter et, dans les conditions qui régissent les systèmes de traitement des eaux usées, celles-ci peuvent probablement se refléter simultanément dans plusieurs modèles. Il faudra entreprendre des recherches bien plus poussées pour élucider ce problème.

2. En attendant, le mode opératoire exposé dans le corps de texte (chapitre C.10-A) peut être suivi, mais il ne s'applique qu'à la biodégradabilité primaire, à des concentrations suffisamment basses (< 100 µg/l), et requiert une méthode d'analyse validée. Le pourcentage de biodégradation peut être calculé (voir au paragraphe 54 de la présente méthode d'essai), mais à condition de tenir compte des processus non biologiques (adsorption, volatilité, etc.). L'étude conduite par Nyholm et son équipe (1) (2) sur un cycle de quatre heures dans un système à lit de contact en est un exemple. Ils ont opposé des pseudo-constantes de premier ordre pour cinq substances chimiques ajoutées à des eaux usées synthétiques à raison de 5 à 100 µg/l (s'agissant de la biodégradabilité finale, des substances d'essai marquées au ^{14}C peuvent être utilisées). La description d'un procédé n'entre pas dans le cadre de la présente méthode d'essai dans la mesure où aucun ne fait encore l'unanimité, bien qu'une méthode proposée pour la norme ISO 14592 (3) contienne des indications concernant l'emploi de substances marquées au ^{14}C.

Essai de biodégradation en semi-continu à l'aide de boues activées

3. Un essai plus simple en deux étapes a été présenté ultérieurement (4) (5) (6); la méthode en semi-continu à l'aide de boues activées (SCBA) est suivie par des essais cinétiques à court terme pratiqués sur des échantillons prélevés dans les unités SCBA. Les débits de boues épuisées sont connus dans le système SCBA (contrairement à la méthode d'essai originale C.12), qui est alimenté par des eaux usées synthétiques (formule de l'OCDE modifiée) ou par des eaux usées domestiques. Les eaux usées synthétiques ont été modifiées (à cause de la fluctuation du pH et de la mauvaise décantabilité des boues) par addition d'un tampon phosphate, d'un extrait de levure, de chlorure de fer (III) et de sels d'oligo-éléments, et leur DCO a été relevée jusqu'à environ 750 mg/l moyennant une augmentation de la concentration de peptone et d'extrait de viande. Les unités tournaient en cycles de 24 heures: aération pendant 23 heures, épuisement des boues, décantation, enlèvement du surnageant (effluent), suivis par l'adjonction des eaux usées synthétiques et de la substance d'essai jusqu'à 100 µg/l (c'est-à-dire à peu près la même concentration que celle appliquée dans l'essai à court terme). Une fois par semaine, on remplace 10 pour cent de la totalité des boues par des boues fraîches, afin de maintenir l'équilibre de la population de micro-organismes.

4. Les concentrations de la substance d'essai sont mesurées au début et à la fin de l'aération, et l'essai est poursuivi jusqu'à ce que l'élimination de la substance d'essai devienne constante, ce qui peut prendre une semaine à plusieurs mois.

Essai à court terme

5. Pratiquer un essai à court terme (8 heures, par exemple), afin de déterminer la pseudo-constante cinétique de premier ordre relative à la dégradation de la substance d'essai dans des boues activées ayant des origines et des évolutions différentes, mais connues. En particulier, prélever des échantillons de boues des réacteurs SCBA – à la fin d'une période d'aération lorsque la concentration de substrat organique est basse – au cours d'un essai d'acclimatation (paragraphes 3, 4). On peut aussi prélever des boues d'une unité SCBA

▼M4

tournant en parallèle et non exposée à la substance d'essai, pour comparaison. Aérer des mélanges de boue et de substance d'essai incorporée à deux ou plusieurs concentrations comprises entre 1 et 50 µg/l, sans ajouter d'eaux usées synthétiques ni d'autre substrat organique. La substance d'essai restant en solution est mesurée à intervalles réguliers, par exemple toutes les heures, suivant la dégradabilité de la substance, durant une période qui n'excède pas 24 heures. Centrifuger les échantillons avant de les soumettre à une analyse appropriée..

Calculs

6. Les données provenant des unités SCBA servent à calculer le pourcentage d'élimination de la substance d'essai (paragraphe 54). Une constante de vitesse moyenne, K_1 (établie en fonction de la concentration des solides en suspension), peut aussi être calculée à partir de la formule suivante:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

Où:

t = durée d'aération (23 h)

C_e = concentration à la fin de la période d'aération (µg/l)

C_i = concentration au début de l'aération (µg/l)

SS = concentration des solides des boues activées (g/l)

7. Dans l'essai à court terme, tracer la courbe du logarithme de la concentration (%) restante en fonction du temps; la pente de la partie initiale (10-50 pour cent de dégradation) de la courbe est équivalente à K_1, la pseudo-constante de premier ordre. Établir la constante en fonction de la concentration des solides des boues en divisant la pente par la concentration de ces solides. Le résultat indiqué doit préciser les concentrations initiales de la substance d'essai et des solides en suspension, le temps de rétention des boues, la charge et la source des boues ainsi que, le cas échéant, la préexposition à la substance d'essai.

Variabilité des résultats

8. La variabilité et d'autres aspects de la cinétique de biodégradation ont été examinés lors d'une réunion récente du SETAC (7). Qu'elles aient fait l'objet de publications ou qu'il s'agisse de projets, ces études devraient bientôt livrer une image plus claire de la cinétique qui gouverne le traitement des eaux usées dans les stations et permettre ainsi de mieux interpréter les données existantes et d'avancer des conceptions plus pertinentes concernant de futures méthodes d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) Nyholm N., Jacobsen B.N., Pedersen B.M., Poulsen O., Dambourg A. and Schultz B. (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339-353.

(2) Jacobsen B.N., Nyholm N., Pedersen B.M., Poulsen O., and Ostfeldt P. (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505-1510.

(3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼**M4**

(4) Nyholm N., Ingerslev F., Berg U.T., Pedersen J.P. and Frimer-Larsen H. (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851-864.

(5) Berg U.T. and Nyholm N. (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. Chemosphere 33 (4): 711-735.

(6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

(7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, S.G. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4-6th September 1996. SETAC – Europe, Brussels.

▼M4

C.10-B: Biofilms

INTRODUCTION

1. Les essais de simulation s'appliquent normalement aux substances chimiques qui ont donné un résultat négatif à l'essai de biodégradabilité immédiate [chapitre C.4-A à F de la présente annexe (9)], mais un résultat positif à l'essai de biodégradabilité intrinsèque. Exceptionnellement, les essais de simulation se pratiquent aussi en vue d'obtenir des informations supplémentaires sur une substance d'essai, en particulier les substances chimiques produites en grandes quantités, et l'on recourt normalement à l'essai de traitement par boues activées (C.10-A). Toutefois, dans certaines circonstances, il y a lieu de connaître certaines données particulières concernant la réaction d'une substance chimique à des méthodes de traitement des eaux usées comportant des biofilms, à savoir des lits à ruissellement ou lits bactériens, des disques biologiques et des lits fluidisés. Différents dispositifs ont été créés à cette fin.

2. Gerike *et al.* (1) ont utilisé de grands lits bactériens en mode couplé à l'échelle pilote. Ces lits occupaient beaucoup d'espace et exigeaient des volumes relativement élevés d'eaux usées domestiques ou synthétiques. Truesdale *et al.* (2) ont décrit des lits plus petits (1,83 m × 0,15 m de diamètre) alimentés par des eaux usées naturelles dépourvues de tensioactifs, mais qui demandaient encore des volumes assez importants. Il ne fallait pas moins de 14 semaines pour qu'un biofilm arrive à «maturité» et 4 à 8 semaines supplémentaires après la première introduction du tensioactif d'essai pour l'acclimatation.

3. Baumann et al. (3) ont mis au point un lit beaucoup plus petit à base de polyester «velu» préalablement plongé dans des boues activées, servant de substrat inerte pour le biofilm. La substance d'essai constituait la seule source de carbone et la biodégradabilité était évaluée d'après la mesure du carbone organique dissous (COD) dans les eaux à traiter et les effluents, et la quantité de CO_2 dans les dégagements gazeux.

4. Une approche assez différente a été tentée par Gloyna *et al.* (4), qui ont inventé le réacteur tubulaire rotatif. Ils ont cultivé un biofilm sur la surface interne d'un tube rotatif, sur la superficie connue, en y faisant passer des eaux à traiter qu'ils déversaient au sommet du tube légèrement incliné par rapport à l'horizontale. Le réacteur a servi à étudier la biodégradabilité des tensioactifs (5) ainsi que l'épaisseur optimale du biofilm et la diffusion à travers le film (6). Ces auteurs ont perfectionné le réacteur, notamment pour pouvoir déterminer le CO_2 dans les dégagements gazeux.

5. Le réacteur tubulaire rotatif a été adopté par le Standing Committee of Analysts (Royaume-Uni) comme méthode de référence pour évaluer la biodégradabilité des substances chimiques (7) ainsi que les possibilités de traitement des eaux usées et leur toxicité (8). La méthode décrite ici est simple, concise et reproductible et, de surcroît, ne nécessite que des volumes relativement petits de milieu organique.

PRINCIPE DE L'ESSAI

6. Des eaux usées synthétiques ou domestiques et la substance d'essai sont appliquées, séparément ou incorporées, sur la surface interne d'un tube incliné en rotation lente. Une couche de micro-organismes, semblables à ceux présents dans le milieu du biofiltre, se développe sur la surface interne. Le fonctionnement du réacteur est régulé de telle sorte qu'il entraîne une élimination adéquate de la matière organique et, si nécessaire, l'oxydation de l'ammonium.

▼M4

7. Les effluents du tube sont collectés et décantés et/ou filtrés avant l'analyse du carbone organique dissous (COD) et/ou de la substance d'essai par une méthode spécifique. Les unités témoins, qui ne reçoivent pas la substance d'essai, tournent en parallèle dans les mêmes conditions, à des fins de comparaison. La différence entre les concentrations de COD dans les effluents de l'unité d'essai et de l'unité témoin est imputée par hypothèse à la substance d'essai et à ses métabolites organiques. On compare cette différence à la concentration de la substance d'essai ajoutée (en termes de COD) pour calculer l'élimination de la substance d'essai.

8. Il est normalement possible de distinguer la biodégradation de la bioadsorption par un examen attentif de la courbe d'élimination en fonction du temps. L'observation peut généralement être confirmée par un essai de biodégradabilité immédiate (consommation d'oxygène ou production de dioxyde de carbone) réalisé à l'aide d'un inoculum acclimaté prélevé à la fin de l'essai dans les réacteurs qui reçoivent la substance d'essai.

INFORMATION SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

9. La pureté, la solubilité dans l'eau, la volatilité et les caractéristiques d'adsorption de la substance d'essai doivent être connues pour que l'interprétation des résultats soit correcte.

10. Normalement, les substances chimiques volatiles et peu solubles ne peuvent être mises à l'essai sans précautions particulières (voir appendice 5 du chapitre C.10-A). Il faudrait connaître également la formule chimique développée ou, au moins, empirique, pour calculer les valeurs théoriques et/ou vérifier les valeurs mesurées de paramètres tels que la demande théorique en oxygène (DthO) et le carbone organique dissous (COD).

11. Des données sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes (voir appendice 4 du chapitre C.10-A) peuvent aussi être utiles à la sélection des concentrations d'essai appropriées et essentielles pour l'interprétation correcte de faibles valeurs de biodégradation.

NIVEAUX DE SEUIL

12. À l'origine, la mise sur le marché des tensioactifs était subordonnée à un taux de biodégradation primaire supérieur ou égal à 80 pour cent. Faute d'atteindre un taux de 80 pour cent, on peut mener cet essai de simulation (de confirmation) à l'issue duquel le tensioactif ne sera mis sur le marché que s'il est éliminé à plus de 90 pour cent. En général, avec les produits chimiques, la question d'un résultat d'essai positif ou négatif n'entre pas en jeu, et le pourcentage d'élimination obtenu peut servir à calculer en gros la concentration probable dans l'environnement à introduire dans l'évaluation des risques dus aux substances chimiques. Le pourcentage d'élimination du COD atteint dans plusieurs études sur des substances chimiques pures était supérieur à 90 pour cent pour plus des trois quarts des produits chimiques présentant un degré de biodégradabilité significatif et supérieur à 80 pour cent pour plus de 90 pour cent d'entre eux.

SUBSTANCES CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE

13. Pour s'assurer que le mode opératoire est correctement suivi, il est quelquefois utile de tester des substances chimiques dont le comportement est connu. Il s'agit notamment de l'acide adipique, du 2-phénylphenol, du 1-naphthol, de l'acide diphénique, de l'acide 1-naphthoïque.

REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS D'ESSAI

14. L'écart-type obtenu par un laboratoire britannique s'élevait à 3,5 % au moment des essais et à 5 % entre les essais (7).

▼**M4**

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareils

Réacteurs tabulaires rotatifs

15. L'appareil (voir figures 1 et 2 de l'appendice 8) consiste en une batterie de tubes en acrylique de 30,5 cm de long et 5 cm de diamètre interne, supportés par des roulettes entourées de caoutchouc, fixées sur un cadre métallique. Chaque tube s'accroche aux roulettes par un bourrelet extérieur de 0,5 cm d'épaisseur environ, et possède un bourrelet interne de la même épaisseur à l'extrémité supérieure (d'alimentation) pour retenir le liquide; la surface interne a été rendue rugueuse par un tampon de laine à poils épais. Les tubes sont inclinés à un angle d'environ un degré par rapport à l'horizontale pour que le milieu d'essai appliqué sur un tube propre reste en contact avec celui-ci le temps nécessaire. Les roulettes revêtues de caoutchouc sont actionnées par un moteur lent à vitesse variable. La température des tubes est régie par leur installation dans un local à température constante.

16. En enfermant chaque réacteur tubulaire dans un tube légèrement plus grand et fermé par un capuchon en veillant à ce que les connexions soient étanches aux gaz, on peut collecter les dégagements de CO_2 dans une solution alcaline en vue de mesures ultérieures (6).

17. Chaque tube est alimenté en milieu organique et en substance d'essai, le cas échéant, par un réservoir de 20 litres (A) (voir figure 2) pour une période de 24 heures. Si nécessaire, la solution de la substance d'essai peut être dosée séparément. Il existe un orifice de sortie situé près du fond de chaque réservoir connecté par un tuyau fait d'une matière appropriée, par exemple du caoutchouc de silicone, via une pompe péristaltique (B) à un tube en verre ou en acrylique qui s'enfonce sur 2 à 4 cm à l'intérieur de l'extrémité supérieure (d'alimentation) du tube incliné (C). L'effluent s'égoutte ainsi de l'extrémité inférieure du tube incliné dans un autre récipient de stockage (D). L'effluent est décanté ou filtré avant analyse.

Appareil de filtration – centrifugeuse

18. Les échantillons seront filtrés à travers une membrane possédant une porosité adéquate (diamètre d'ouverture nominale de 0,45 μm) qui adsorbe les composés organiques solubles et libère le moins possible de carbone organique. Si les lits utilisés libèrent du carbone organique, il faut les laver soigneusement à l'eau chaude afin d'évacuer le carbone organique lixiviable. Une centrifugeuse tournant à 40 000 m/s^2 peut remplacer l'appareil de filtration.

19. Matériel d'analyse permettant de déterminer:

— le rapport carbone organique dissous (COD)/carbone organique total (COT), ou la demande chimique en oxygène (DCO),

— la substance chimique donnée (CLHP, CG, etc.) s'il y a lieu,

— le pH, la température, l'acidité, l'alcalinité,

— l'ammonium, les nitrites et les nitrates, si les essais sont réalisés dans des conditions nitrifiantes.

Eau

20. Eau du robinet renfermant moins de 3 mg/l de COD.

21. Eau distillée ou désionisée contenant moins de 2 mg/l de COD.

▼M4

Milieu organique

22. Les eaux usées synthétiques, les eaux usées domestiques ou un mélange des deux sont acceptés comme milieu organique. Comme il a été démontré que les eaux usées domestiques employées seules augmentaient souvent le pourcentage d'élimination du COD (dans les unités à boues activées) et entraînaient même la biodégradation de certaines substances chimiques non biodégradées par les eaux usées synthétiques formulées selon l'OCDE, on préconise l'utilisation d'eaux usées domestiques. On mesure la concentration du COD ou de la DCO dans chaque nouveau lot de milieu organique. L'acidité ou l'alcalinité du milieu organique doivent être connues. Il peut être nécessaire de tamponner le milieu organique par un composé approprié (hydrogénocarbonate de sodium ou hydrogénophosphate de potassium) s'il est faiblement acide ou alcalin, pour maintenir le pH à environ 7,5 ± 0,5 dans le réacteur durant l'essai. La quantité de tampon à ajouter et le moment de cette addition seront décidés au cas par cas.

Eaux usées synthétiques

23. Dans chaque litre d'eau du robinet, dissoudre 160 mg de peptone, 110 mg d'extrait de viande, 30 mg d'urée, 28 mg d'hydrogénophosphate de potassium anhydre (K_2HPO_4), 7 mg de chlorure de sodium (NaCl), 4 mg de chlorure de calcium dihydraté ($CaCl_2.2H_2O$) et 2 mg de sulfate de magnésium heptahydraté ($MgSO_4.7H_20$). Cette eau usée synthétique formulée selon l'OCDE offre un exemple où la concentration moyenne de COD dans les eaux à traiter atteint quelque 100 mg/l. On utilisera en alternance d'autres compositions donnant à peu près la même concentration de COD, plus proches des eaux usées domestiques. Ces eaux usées synthétiques peuvent être confectionnées à base d'eau distillée, sous une forme concentrée, et stockées à environ 1 °C pendant une semaine au maximum. Selon les besoins, diluer avec de l'eau du robinet (ce milieu n'est pas satisfaisant, notamment parce qu'il présente une concentration en azote très élevée et une teneur en carbone relativement faible, mais rien de mieux n'a été suggéré, en dehors d'un supplément de tampon phosphate et de peptone).

Eaux usées domestiques

24. Utiliser des eaux usées qui viennent d'être décantées, recueillies quotidiennement dans une station d'épuration qui reçoit principalement des eaux usées domestiques. Elles doivent être prélevées au niveau du déversoir de la cuve de sédimentation primaire ou dans les eaux à traiter de la station de traitement par boues activées et renfermer très peu de grosses particules. Les eaux usées peuvent être utilisées après plusieurs jours de stockage à environ 4 °C, s'il est prouvé que le COD (ou la DCO) n'a pas diminué de manière significative (c'est-à-dire de moins de 20 pour cent) durant le stockage. Afin de limiter la perturbation du système, il conviendrait d'ajuster le COD (ou la DCO) de chaque nouveau lot avant son utilisation à une valeur constante adéquate, par exemple en le diluant avec de l'eau du robinet.

Lubrifiant

25. Les roulettes de la pompe péristaltique peuvent être lubrifiées avec du glycérol ou de l'huile d'olive: les deux conviennent aux tubes en caoutchouc de silicone.

Solutions mères de la substance d'essai

26. Pour les substances chimiques présentant une solubilité convenable, préparer des solutions mères aux concentrations appropriées (par exemple, 1 à 5 g/l) dans de l'eau désionisée, ou dans la fraction minérale de l'eau usée synthétique. En ce qui concerne les substances chimiques insolubles, se reporter à l'appendice 5 du chapitre C.10-A. La présente méthode n'est pas applicable aux substances chimiques volatiles sans modification préalable des réacteurs tubulaires (paragraphe 16). Déterminer le COD et le carbone organique total (COT) de la solution mère et répéter les mesures à chaque nouveau lot. Si la différence entre le COD et le COT excède 20 pour cent, il faut vérifier

▼M4

l'hydrosolubilité de la substance d'essai. Comparer le COD ou la concentration de la substance d'essai mesurée par une analyse spécifique dans la solution mère à la valeur nominale, pour s'assurer que la récupération est suffisante (elle dépasse normalement 90 pour cent). Vérifier, en particulier pour les dispersions, si le COD peut être utilisé comme paramètre d'analyse ou si seule une technique d'analyse spécifique de la substance d'essai est praticable. Les dispersions imposent la centrifugation des échantillons. Pour chaque nouveau lot, mesurer le COD, la DCO, ou la substance d'essai par une analyse spécifique.

27. Déterminer le pH de la solution mère. Les valeurs extrêmes indiquent que l'addition de la substance est susceptible d'influencer le pH des boues activées dans le système d'essai. Dans ce cas, il faut neutraliser la solution mère à pH 7 ± 0,5 avec de faibles quantités d'un acide ou d'une base inorganiques, tout en évitant la précipitation de la substance d'essai.

MODE OPÉRATOIRE

Préparation du milieu organique à doser

28. Nettoyer à fond les récipients destinés à recevoir les eaux à traiter et les effluents ainsi que les tuyaux reliant ces deux récipients, afin de prévenir toute prolifération de micro-organismes, au début de l'essai et tout au long de celui-ci.

29. Utiliser des eaux usées synthétiques (paragraphe 23) préparées le jour même, en diluant dans les proportions requises les solides ou la solution mère concentrée avec de l'eau du robinet. La quantité nécessaire est mesurée dans un cylindre et versée dans un récipient propre destiné à recevoir les eaux à traiter. S'il y a lieu, ajouter la quantité voulue de solution mère de la substance d'essai ou de substance de référence aux eaux usées synthétiques avant la dilution. Si cela est plus approprié, ou nécessaire afin d'éviter des pertes de substance d'essai, préparer à part une solution diluée de la substance d'essai dans un autre récipient et répartir cette dernière dans les tubes inclinés au moyen d'une autre pompe doseuse.

30. En alternance (et de préférence), utiliser des eaux usées domestiques décantées (paragraphe 24) récoltées le jour même si possible.

Fonctionnement des réacteurs tubulaires rotatifs

31. L'évaluation de la substance d'essai demande deux réacteurs tubulaires identiques assemblés dans un local à température constante, normalement à 22 ± 2 °C.

32. Ajuster les pompes péristaltiques de façon à répartir 250 ± 25 ml/h de milieu organique (sans substance d'essai) dans les tubes inclinés, qui tournent à 18 ± 2 tr/min. Lubrifier (paragraphe 25) les tuyaux de la pompe au début de l'essai et régulièrement au cours de celui-ci afin de lui assurer un bon fonctionnement et de prolonger la vie des tuyaux.

33. Régler l'angle d'inclinaison des tubes par rapport à l'horizontale de façon à produire un temps de séjour de l'eau d'alimentation de 125 ± 12,5 secondes dans un tube propre. Estimer le temps de rétention en ajoutant un marqueur non biologique (par exemple: NaCl, un colorant inerte) à l'eau d'alimentation: le temps requis pour atteindre la concentration maximale dans l'effluent est censé être le temps de rétention moyen (quand le développement du film est à son maximum, le temps de rétention peut s'accroître jusqu'à environ 30 minutes).

34. On a constaté que ces débits, vitesses et temps donnaient des pourcentages d'élimination adéquats (supérieurs à 80 pour cent) de COD (ou DCO) et engendraient des effluents nitrifiés. Le débit doit être modifié si l'élimination est insuffisante ou s'il y a lieu de simuler le fonctionnement d'une station d'épuration donnée. Dans ce cas, ajuster le débit de dose du milieu organique jusqu'à ce que le fonctionnement du réacteur s'aligne sur celui de la station d'épuration.

▼M4

Inoculation

35. L'inoculation par exposition à l'air peut suffire à déclencher la croissance des micro-organismes lorsqu'on utilise des eaux usées synthétiques, sinon on ajoutera 1 ml/l d'eaux usées décantées à l'alimentation pendant trois jours.

Mesures

36. Vérifier à intervalles réguliers que les débits de dose et les vitesses de rotation restent dans les limites requises. Mesurer aussi le pH de l'effluent, en particulier s'il devrait y avoir une nitrification.

Échantillonnage et analyse

37. La méthode, la répartition et la fréquence de l'échantillonnage sont choisies en fonction de la finalité de l'essai. Prélever au hasard des échantillons d'eaux à traiter et d'effluents, par exemple, ou récolter des échantillons sur une période plus longue, comprise entre trois et six heures, par exemple. Durant la première période, à savoir en l'absence de substance d'essai, prélever des échantillons deux fois par semaine. Les échantillons sont filtrés à travers des membranes ou centrifugés à quelque 40 000 m/s^2 pendant environ 15 minutes (paragraphe 18). Il peut être nécessaire de décanter et/ou de filtrer grossièrement les échantillons avant leur filtration à travers la membrane. Déterminer le COD (ou la DCO) au moins deux fois et, selon les besoins, la DBO, l'ammonium, les nitrites et les nitrates.

38. Toutes les analyses doivent être exécutées le plus vite possible après la collecte et la préparation des échantillons. Au cas où les analyses doivent être différées, conserver les échantillons à environ 4 °C à l'obscurité dans des bouteilles pleines et bouchées hermétiquement. S'il y a lieu de stocker les échantillons pendant plus de 48 heures, les conserver par congélation, acidification ou adjonction d'une substance toxique appropriée [par exemple 20 ml/l d'une solution de chlorure de mercure (II) à 10 g/l]. S'assurer que la technique de conservation n'influence pas les résultats de l'analyse.

Période de mise en route

39. Durant cette période, le biofilm superficiel se développe jusqu'à atteindre une épaisseur optimale, ce qui prend normalement environ deux semaines et ne doit pas en dépasser six. L'élimination (paragraphe 44) du COD (ou de la DCO) s'accroît et atteint un plateau. Lorsque le plateau présente la même valeur dans les deux tubes, sélectionner le tube qui servira de témoin pour le restant de l'essai, au cours duquel leur fonctionnement devra conserver les mêmes caractéristiques..

Introduction de la substance d'essai

40. À ce stade, ajouter la substance d'essai dans l'autre réacteur à la concentration requise, ordinairement 10 à 20 mg C/l. Le témoin continue de ne recevoir que le milieu organique.

Période d'acclimatation

41. Poursuivre les analyses bihebdomadaires du COD (ou de la DCO) et, s'il faut évaluer la biodégradabilité primaire, mesurer aussi la concentration de la substance d'essai par une analyse spécifique. Appliquer une période d'acclimatation d'une à six semaines (ou davantage dans des conditions spéciales) après la première adjonction de la substance d'essai. Lorsque le pourcentage d'élimination (paragraphes 43-45) atteint son maximum, déterminer 12 à 15 valeurs valables au cours de la phase plateau sur environ trois semaines, afin d'évaluer le pourcentage d'élimination moyen. L'essai est considéré comme terminé si un degré d'élimination suffisamment élevé a été obtenu. L'essai ne doit normalement pas se prolonger au-delà de 12 semaines après la première introduction de la substance d'essai.

▼M4

Détachement du film

42. Le brusque détachement de grandes quantités de film excédentaire des tubes («sloughing») se produit assez régulièrement. On veillera à ce que ce processus n'altère pas la comparabilité des résultats, en laissant les essais couvrir au moins deux cycles complets de croissance et de détachement.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

43. Calculer le pourcentage d'élimination de la substance d'essai en termes de COD (ou de DCO) pour chaque évaluation programmée dans le temps à l'aide de la formule suivante:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

où:

D_t = pourcentage d'élimination du COD (ou de la DCO) à l'instant t;

C_s = concentration de COD (ou DCO) dans les eaux à traiter due à la substance d'essai, estimée de préférence d'après la concentration dans la solution mère et le volume de cette solution ajouté (mg/l);

E = COD (ou DCO) mesurés dans les effluents d'essai à l'instant t (mg/l);

E_o = COD (ou DCO) mesurés dans les effluents témoins à l'instant t (mg/l).

Répéter le calcul pour la substance de référence, le cas échéant.

Résultats du réacteur témoin

44. Le degré d'élimination du COD ou de la DCO (D_B) du milieu organique dans les réacteurs témoins est utile pour éaluer l'activité de biodégradation du biofilm durant l'essai. Calculer le pourcentage d'élimination selon l'équation suivante:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\ \%$$

où:

C_m = COD (ou DCO) du milieu organique dans les eaux à traiter témoins (mg/l).

45. Calculer l'élimination (D_{ST}) de la substance d'essai, si elle a été mesurée par une méthode d'analyse spécifique, à chaque instant d'évaluation à partir de l'équation suivante:

$$D_{ST} = 100\ (1 - Se/Si)\ \%$$

où:

Si = concentration mesurée ou, de préférence, estimée de la substance d'essai dans les eaux brutes d'essai (mg/l)

Se = concentration mesurée de la substance d'essai dans les effluents d'essai à l'instant t (mg/l)

▼M4

Si la méthode d'analyse donne une valeur positive dans les eaux usées non améliorées équivalente à S_c mg/l, calculer le pourcentage d'élimination (D_{SC}) selon la formule suivante:

$$D_{SC} = 100\ (Si - Se + Sc)/(Si + Sc)\ \%$$

Expression des résultats de l'essai

46. Porter sur un graphique les pourcentages d'élimination D_t et D_{ST} (ou D_{SC}), s'ils sont disponibles, en fonction du temps (voir appendice 2 du chapitre C.10-A). Prendre la moyenne (arrondie au nombre entier le plus proche) et l'écart-type des 12 à 15 valeurs de D_T (et de D_{ST}, le cas échéant) obtenue au cours de la phase plateau comme pourcentage d'élimination de la substance d'essai. L'allure de la courbe d'élimination permet de tirer certaines conclusions sur les processus d'élimination.

Adsorption

47. Si on observe une élimination substantielle de la substance d'essai en termes de COD au début de l'essai, c'est probablement à cause de l'adsorption de cette substance sur le biofilm. Il devrait être possible de prouver ce phénomène en mesurant la substance d'essai adsorbée sur les solides qui se détachent du film. Il est rare que l'élimination du COD de substances adsorbables demeure élevée tout au long de l'essai; le degré d'élimination est normalement élevé au début, puis décline progressivement jusqu'à une valeur d'équilibre. Si, toutefois, la substance d'essai adsorbée est de nature à acclimater la population de micro-organismes, l'élimination de la substance d'essai en termes de COD augmenterait pour atteindre une valeur de plateau élevée.

Phase de latence

48. Beaucoup de substances d'essai, comme cela se produit dans les essais de sélection statiques, traversent une phase de latence avant que la biodégradation n'opère à plein régime. Durant la phase de latence, les bactéries responsables de la dégradation s'acclimatent ou s'adaptent et n'éliminent presque pas la substance d'essai; ensuite elles commencent à croître. Après l'achèvement de cette phase, on considère de manière arbitraire que la phase de dégradation débute lorsque 10 pour cent environ de la quantité initiale de la substance d'essai est éliminée (après avoir laissé l'adsorption se produire, le cas échéant). La phase de latence est souvent très variable et peu reproductible.

Phase plateau

49. Le plateau de la courbe d'élimination d'un essai conduit en continu est défini comme la phase au cours de laquelle la dégradation est maximale. La phase plateau doit durer au moins trois semaines et être déterminée grosso modo par 12 à 15 valeurs mesurées valables.

Degré d'élimination moyen de la substance d'essai

50. Calculer la moyenne des valeurs d'élimination D_t (et D_{ST} le cas échéant) de la substance d'essai durant la phase plateau. Arrondie au nombre entier le plus proche (1 pour cent), elle représente le degré d'élimination de la substance d'essai. On recommande également de calculer l'intervalle de confiance à 95 pour cent de la valeur moyenne. Calculer de la même manière le degré moyen (D_B) d'élimination du milieu organique dans le récipient témoin.

▼M4

Indication de la biodégradation

51. Si la substance d'essai n'est pas adsorbée de façon significative sur le biofilm et que la courbe d'élimination présente le profil typique d'une courbe de biodégradation avec phase de latence, dégradation et plateau (paragraphes 48, 49), l'élimination mesurée est avec certitude attribuable à la biodégradation. Si l'élimination est élevée au début, l'essai de simulation ne permet pas de faire la distinction entre les processus d'élimination biologiques et non biologiques. Dans ces cas-là, comme dans d'autres où la biodégradation suscite des doutes (par exemple si on observe une séparation), analyser les substances d'essai adsorbées sur des échantillons du film ou effectuer des essais de biodégradation statiques (de sélection) supplémentaires fondés sur des paramètres qui attestent clairement des processus biologiques. Il s'agit d'essais reposant sur la consommation d'oxygène (chapitre C.4 de la présente annexe, D, E et F) (9) ou sur la mesure de la production de dioxyde de carbone (chapitre C.4-C de la présente annexe ou méthode de l'espace de tête – ou de l'espace tête) (10); il convient d'utiliser comme inoculum un biofilm préexposé issu du bioréacteur approprié.

52. Si l'élimination du COD et de la substance proprement dite ont été mesurées, des différences significatives entre les pourcentages observés (le premier étant inférieur au second) indiquent que les effluents renferment des produits organiques intermédiaires susceptibles d'être plus difficiles à dégrader; ceux-ci doivent être examinés.

Validité des résultats de l'essai

53. Considérer l'essai comme valable si le degré d'élimination (D_B) du COD ou de la DCO dans les unités témoins est supérieur à 80 pour cent après deux semaines de fonctionnement et qu'aucun phénomène inhabituel n'a été observé.

54. Si une substance de référence facilement biodégradable a été mise à l'essai, le degré de biodégradation doit être supérieur à 90 pour cent et la différence entre des valeurs mesurées en parallèle ne doit pas excéder 5 pour cent. Faute de satisfaire à ces deux critères, réexaminer les méthodes expérimentales et/ou prélever des eaux usées domestiques à une autre source.

55. De même, les différences de valeurs de biodégradation entre deux unités identiques (le cas échéant) traitant une substance d'essai ne doivent pas s'écarter de plus de cinq pour cent. Si ce critère n'est pas rempli, mais que l'élimination est élevée, poursuivre l'analyse pendant trois semaines supplémentaires. Si l'élimination est faible, étudier les effets inhibiteurs de la substance d'essai, s'ils ne sont pas connus, et recommencer l'essai à une concentration plus basse de la substance d'essai, si c'est possible.

Rapport d'essai

56. Le rapport d'essai doit livrer les informations suivantes:

Substance d'essai:

— nature chimique,

— état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques.

Conditions d'essai:

— toute modification du système d'essai, notamment si des substances volatiles ou insolubles ont été testées,

— type de milieu organique,

— proportion et nature des déchets industriels dans les eaux usées, si cette information est pertinente et connue,

— méthode d'inoculation,

▼M4

— solution mère de la substance d'essai – teneurs en COD (carbone organique dissous) et COT (carbone organique total); mode de préparation, dans le cas d'une suspension; concentration(s) d'essai utilisée(s), justification des concentrations de COD qui sortiraient de l'intervalle 10-20 mg/l; méthode d'addition; date de la première adjonction; toute variation de concentration,

— temps de rétention hydraulique moyen (sans croissance); vitesse de rotation du tube, angle d'inclinaison approximatif, si possible,

— détails du détachement du biofilm; moment et intensité,

— température d'essai et gamme de températures,

— techniques d'analyse employées.

Résultats de l'essai:

— toutes les valeurs mesurées: COD, DCO, analyses spécifiques, pH, température, composés azotés, le cas échéant,

— toutes les valeurs calculées de D_t (ou D_{tc}), D_B, D_s présentées sous forme de tableaux et de courbes d'élimination,

— informations sur les phases de latence et de plateau, durée de l'essai, degré d'élimination de la substance d'essai, de la substance de référence (si testée) et du milieu organique (dans l'unité témoin), données statistiques, conclusions sur la biodégradabilité et validité de l'essai,

— examen des résultats.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) Gerike P., Fischer W., Holtmann W. (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. Wat. Res. 14: 753-758.

(2) Truesdale G.A., Jones K., Vandyke K.G. (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material.Wat. Waste Tr. J. 7: 441-444.

(3) Baumann U., Kuhn G. and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(4) Gloyna E.F., Comstock R.F., Renn C.E. (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355-1357.

(5) Kumke G.W., Renn C.E. (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92-94.

(6) Tomlinson T.G., Snaddon D.H.M. (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. Int.J. Air Wat. Pollut. 10: 865-881.

(7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.

(8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

(9) Chapitre C.4 de la présente annexe, Détermination de la biodégradabilité «facile», A-F.

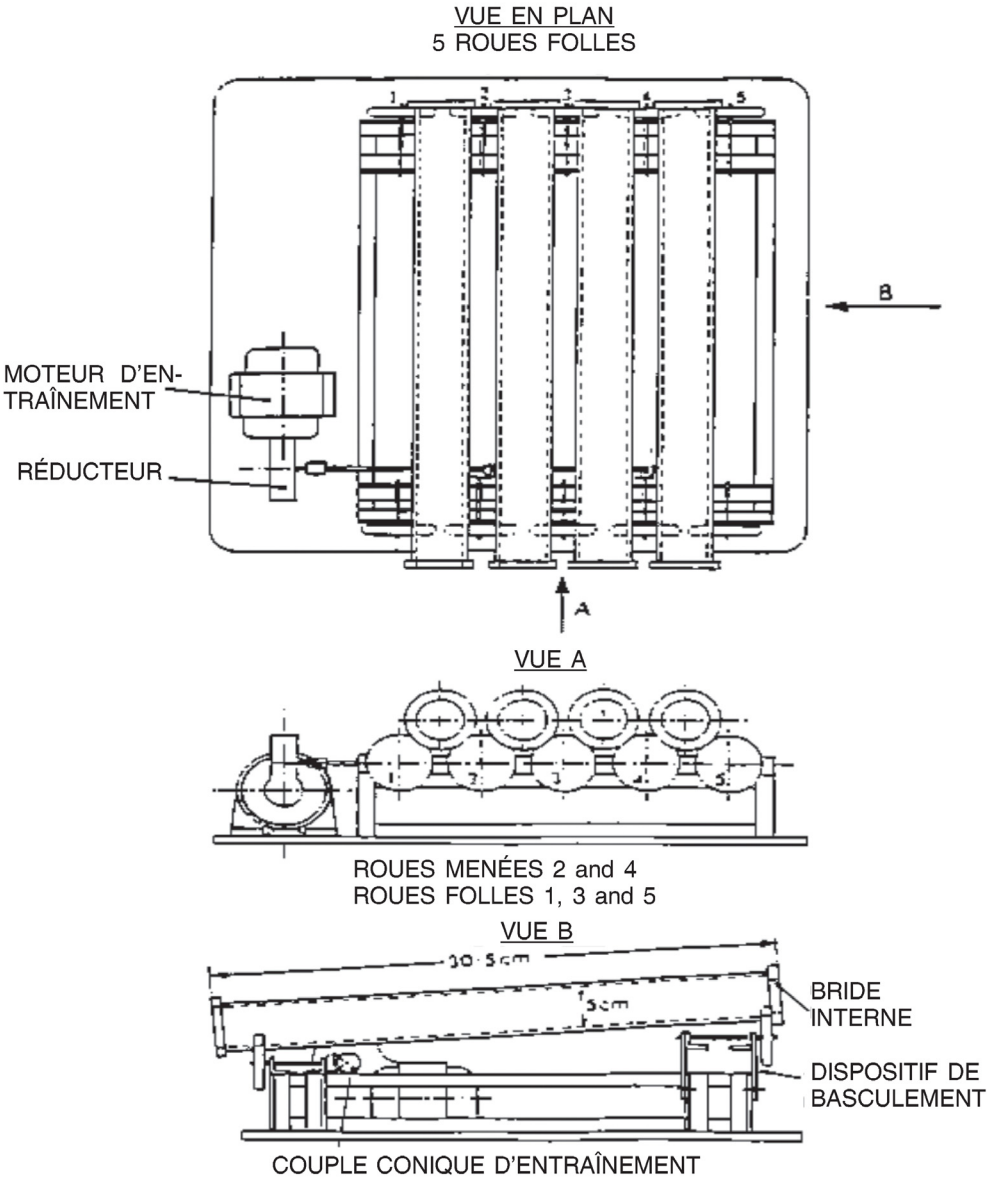
(10) ISO 14593 (1998). Qualité de l'eau – Évaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie ultime des composés organiques. Méthode par analyse du carbone inorganique dans des récipients hermétiquement clos (Essai au CO_2 dans l'espace de tête).

▼**M4**

Appendice 8

Figure 1

Tubes rotatifs



Glossaire

vue en plan.

vue A/B.

roues menées.

roues folles.

moteur d'entraînement.

réducteur.

bride interne.

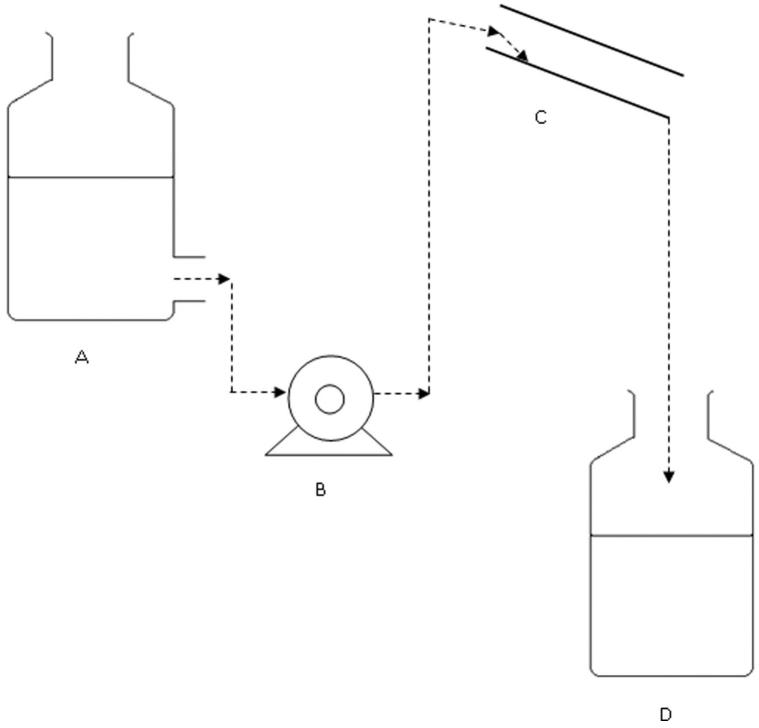
dispositif de basculement.

couple conique d'entraînement.

▼**M4**

Figure 2

Schéma de déroulement



A: réservoir.

B: pompe péristaltique.

C: tube rotatif.

D: récipient recueillant les effluents.

DÉFINITIONS:

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Substances chimiques: «il est à noter que le terme «produit chimique» utilisé dans les accords de la CNUED et dans les documents ultérieurs comprend les substances, les produits, les mélanges, les préparations et tout autre terme utilisé dans les systèmes actuels pour décrire les produits chimiques visés».

▼M6

C.11. BOUE ACTIVÉE, ESSAI D'INHIBITION DE LA RESPIRATION (OXYDATION DU CARBONE ET DE L'AMMONIUM)

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 209 (2010) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Cette méthode d'essai décrit une méthode pour déterminer les effets d'une substance chimique sur les microorganismes des boues activées (essentiellement des bactéries) en mesurant leur taux de respiration (oxydation du carbone et/ou de l'ammonium) dans des conditions données, en présence de différentes concentrations de la substance chimique d'essai. Cette méthode a été établie à partir de l'essai mis au point par l'ETAD (Association écologique et toxicologique des fabricants de teintures) (1) (2), de la précédente ligne directrice 209 de l'OCDE (3) et de la norme ISO 8192 révisée (4). L'objectif de cette méthode de fournir une méthode d'évaluation rapide des effets de substances chimiques sur les microorganismes des boues activées lors de l'étape biologique (aérobie) du processus de traitement des eaux usées en station d'épuration. Les résultats de l'essai peuvent également indiquer les concentrations non inhibitrices des substances chimiques d'essai à utiliser dans les essais de biodégradabilité (par exemple, chapitres C.4 A à F, C.9, C.10, C.12 et C.29 de la présente annexe, ligne directrice 302C de l'OCDE). L'essai se déroule alors comme un essai de dépistage, similaire à un essai préliminaire de détermination des concentrations ou essai limite (voir paragraphe 39), seule la respiration totale étant prise en compte. Cependant, il convient de prendre cette indication en compte avec précaution pour les essais de biodégradation facile (chapitre C.4 A à F et C.29 de la présente annexe) pour lesquels la concentration de l'inoculum est nettement plus faible que celle prévue par la présente méthode d'essai. En fait, l'absence d'inhibition dans cet essai de respiration ne se traduit pas automatiquement par des conditions non inhibitrices dans les essais de biodégradation facile des chapitres C.4 A à F ou C.29 de la présente annexe.

2. Globalement, l'essai d'inhibition de la respiration semble avoir été appliqué avec succès depuis sa première publication, mais dans quelques cas des résultats erronés ont été rapportés (2) (4) (5). Ainsi, les courbes de respiration en fonction de la concentration sont parfois diphasiques, les tracés dose-effet peuvent être faussés et les CE_{50} sont parfois bien plus faibles que prévu (5). Des recherches ont montré que ces résultats apparaissent pour des boues activées fortement nitrifiantes et quand la substance d'essai affecte davantage l'oxydation de l'ammonium que l'oxydation générale hétérotrophe. Il est donc possible de rectifier les résultats faussés en procédant à un essai supplémentaire faisant appel à un inhibiteur spécifique de la nitrification. En quantifiant l'oxygène consommé en présence et en absence d'un inhibiteur de ce type, comme la N-allylthiourée (ATU), on peut calculer les consommations respectives de l'oxydation totale, hétérotrophe et de la nitrification (4) (7) (8). Il est alors possible de déduire l'inhibition induite par la substance d'essai sur les deux mécanismes, ainsi que les CE_{50} pour l'oxydation du carbone organique (hétérotrophe) et de l'ammonium (nitrification) d'après la méthode classique. Notons que dans certains cas rares, l'action inhibitrice de la N-allylthiourée peut être partiellement, voire complètement, annulée si elle forme des complexes avec des substances d'essai ou des adjuvants du milieu, par exemple les ions Cu^{++} (6). Les ions Cu^{++} sont essentiels aux *nitrosomonas*, mais toxiques à plus forte concentration.

3. La nitrification est une étape nécessaire pour éliminer les composés azotés des eaux usées en produisant des espèces gazeuses. Les besoins d'un tel procédé sont aujourd'hui particulièrement pressants pour le traitement aérobie des eaux usées dans les pays de l'UE, les autorités européennes ayant en effet revu à la baisse les concentrations maximales d'azote dans les effluents traités et déversés dans les eaux réceptrices ([1]).

([1]) Directive 91/271/CEE du Conseil du 21 mai 1991 relative au traitement des eaux urbaines résiduaires (JO L 135 du 30.5.1991, p. 40).

▼**M6**

4. En général, la méthode consistant à évaluer seulement l'effet sur les mécanismes d'oxydation du carbone organique convient tout à fait. Certains cas exigent néanmoins d'examiner l'impact sur la nitrification seule, ou sur la nitrification et l'oxydation du carbone organique séparément, afin d'interpréter les résultats et de comprendre les effets observés.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

5. Les taux de respiration d'échantillons de boue activée mis en contact pendant 3 heures avec une eau usée reconstituée sont mesurés dans une cellule hermétique contenant une électrode à oxygène. En fonction d'un scénario d'exposition réaliste, un temps de contact supérieur pourrait s'avérer pertinent. Si la substance d'essai est rapidement dégradée, notamment par hydrolyse abiotique, ou présente une volatilité ne permettant pas de maintenir une concentration fixe, il est possible d'utiliser en plus un temps d'exposition plus court, de 30 minutes par exemple. La sensibilité de chaque lot de boue activée est vérifiée à l'aide d'une substance de référence appropriée le jour de l'exposition. L'essai sert généralement à déterminer la CE_x (par exemple CE_{50}) de la substance d'essai et/ou sa concentration sans effet observé (CSEO).

6. Il est possible de déterminer séparément l'inhibition de la consommation d'oxygène des microorganismes qui oxydent le carbone organique et celle des micro-organismes qui oxydent l'ammonium en mesurant les taux de consommation d'oxygène en présence et en absence de N-allylthiourée, un inhibiteur spécifique de la première étape d'oxydation de l'ammonium en nitrites par les bactéries nitrifiantes. Dans ce cas, le pourcentage d'inhibition du taux de consommation d'oxygène est calculé par comparaison du taux de consommation d'oxygène en présence de la substance d'essai et du taux moyen de consommation d'oxygène des témoins associés ne contenant pas la substance chimique étudiée, en présence et en absence d'un inhibiteur spécifique, la N-allylthiourée.

7. La quantification du taux de consommation d'oxygène pour un mélange aqueux comprenant la substance d'essai et une eau usée reconstituée, sans boue activée, permet de déterminer toute consommation d'oxygène découlant de mécanismes abiotiques.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE CHIMIQUE D'ESSAI

8. Il est nécessaire de connaître les données concernant l'identification de la substance chimique d'essai (de préférence son numéro CAS), son nom (IUPAC), et ses caractéristiques de pureté, de solubilité aqueuse, de pression de vapeur, de volatilité et d'adsorption, pour interpréter correctement les résultats. En général, cet essai ne convient pas aux composés volatils à moins de prendre certaines précautions (voir paragraphe 21).

CHAMP D'APPLICATION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

9. Cette méthode convient aux substances hydrosolubles, peu solubles et volatiles. Il n'est toutefois pas toujours possible d'obtenir les CE_{50} de produits chimiques peu solubles, et les résultats ne seront valides que si la majeure partie (p. ex. plus de 80 %) des substances volatiles restent dans le mélange réactionnel à la fin de la (des) période(s) d'exposition. D'autres données d'analyse sont présentées pour affiner l'estimation de la CE_x (concentration efficace à x %) quand la stabilité ou la volatilité de la substance d'essai sont sujettes à caution.

▼**M6**

SUBSTANCES CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE

10. Les substances chimiques de référence font l'objet d'essais périodiques afin de garantir la fiabilité de la méthode et des conditions d'essai, et de vérifier la sensibilité de chaque lot de boue activée utilisée comme inoculum microbien le jour de l'exposition. La substance de référence recommandée en matière d'inhibition est le 3,5-dichlorophénol (3,5-DCP): son action inhibitrice sur la respiration est bien connue, et elle est employée dans nombre d'essais d'inhibition/de toxicité (4). Le sulfate de cuivre (II) pentahydraté peut également servir de substance de référence pour l'inhibition de la respiration totale (9). La N-méthylaniline peut servir de référence pour inhiber spécifiquement la nitrification (4).

CRITÈRES DE VALIDITÉ ET REPRODUCTIBILITÉ

11. Le taux de consommation d'oxygène des témoins à blanc (dépourvus de substance chimique d'essai ou de référence) ne tombe pas en deçà de 20 mg d'oxygène par gramme de boue activée (en poids sec des solides en suspension) et par heure. Si cette valeur est inférieure, l'essai est répété avec une boue activée lavée ou une boue issue d'une autre source. Le coefficient de variation du taux de consommation d'oxygène dans les témoins répliqués ne dépasse pas 30 % à l'issue de l'essai final.

12. D'après les résultats d'un essai circulaire international organisé en 2004 par l'ISO (4) et faisant appel à une boue activée dérivée d'eaux usées domestiques, la CE_{50} du 3,5-DCP se situerait entre 2 mg/l et 25 mg/l pour la respiration totale, 5 mg/l et 40 mg/l pour la respiration hétérotrophe et entre 0,1 mg/l et 10 mg/l pour la respiration liée à la nitrification. Si la CE_{50} du 3,5-DCP est hors de la fourchette attendue, il convient de répéter l'essai avec une boue activée de source différente. La CE_{50} du sulfate de cuivre (II) pentahydraté est comprise entre 53 et 155 mg/l pour la respiration totale (9).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Récipients et appareils expérimentaux

13. L'utilisation de matériel courant de laboratoire et de l'équipement suivant est nécessaire:

a) Récipients d'essai — par exemple, béchers de 1 000 ml pour accueillir 500 ml de mélange réactionnel (voir élément 5 du graphique 1);

b) Cellules et moyens de fixation pour mesurer la concentration de l'oxygène dissous; électrode à oxygène appropriée; cellule hermétique destinée à contenir l'échantillon sans laisser d'espace vide et équipée d'un enregistreur (par exemple éléments 7, 8, 9 du graphique 1 de l'Appendice 2). Un flacon DBO est aussi envisageable, avec un adaptateur de rodage permettant de fixer hermétiquement l'électrode à oxygène au col du flacon (voir graphique 2 de l'Appendice 3). Pour éviter de perdre du liquide par débordement lors de l'insertion de l'électrode à oxygène, il est conseillé d'introduire au préalable un entonnoir ou un tube de verre dans le flacon, ou d'utiliser des récipients à rebords évasés. Quelle que soit l'option retenue, il convient d'employer un agitateur magnétique ou un autre moyen d'agitation, par exemple une sonde autoagitatrice;

c) Agitateurs magnétiques et barreaux aimantés avec revêtement inerte, utilisables dans la chambre de mesure et/ou les récipients d'essai;

d) Dispositif d'aération: s'il y a lieu, on fait circuler l'air comprimé à travers un filtre adapté pour éliminer les poussières et huiles, puis des bulleurs contenant de l'eau afin de l'humidifier. Le contenu des récipients est aéré

▼M6

à l'aide de pipettes Pasteur, ou de tout autre système d'aération n'entraînant pas l'adsorption des produits chimiques. Il est possible d'employer un agitateur orbital à une vitesse située entre 150 et 250 rpm avec des flacons de 2 000 ml, par exemple, ce qui permet de répondre à la demande en oxygène des boues et de contourner les difficultés liées aux substances chimiques qui moussent trop, aux composés volatils s'échappant du milieu réactionnel, ou aux matières difficiles à disperser par bullage d'air. Le système d'essai se compose généralement d'un certain nombre de béchers aérés en continu et mis en place à intervalles réguliers (par exemple toutes les 10 – 15 minutes environ), puis analysés de manière séquentielle. Toute instrumentation validée permettant à la fois d'aérer les milieux réactionnels et de quantifier le taux de consommation d'oxygène des mélanges est également envisageable;

e) pH-mètre;

f) Centrifugeuse, centrifugeuse de laboratoire classique pour boue capable d'accélérer à 10 000 m/s^2.

Réactifs

14. On utilisera des réactifs de qualité analytique tout au long de l'essai.

Eau

15. On emploiera de l'eau distillée ou désionisée contenant moins de 1 mg/l de COD, sauf mention contraire en faveur d'eau du robinet non chlorée.

Eau usée reconstituée

16. La composition qualitative et quantitative du milieu sera la suivante:

— peptone	16 g
— extrait de viande (ou extrait végétal comparable)	11 g
— urée	3 g
— chlorure de sodium (NaCl)	0,7 g
— chlorure de calcium dihydraté ($CaC1_2$, $2H_2O$)	0,4 g
— sulfate de magnésium heptahydraté ($MgSO_4$, $7H_2O$)	0,2 g
— hydrogénophosphate de potassium anhydre (K_2HPO_4)	2,8 g
— eau distillée ou désionisée q.s.p. 1 litre	

17. Le pH de cette solution est de 7,5 ± 0,5. Si le milieu ainsi préparé n'est pas utilisé immédiatement, il convient de le conserver à l'abri de la lumière entre 0 °C et 4 °C, pendant une semaine maximum, ou dans des conditions n'altérant pas sa composition. Il est important de noter que cette eau usée reconstituée est 100 fois plus concentrée que celle qui est décrite dans le Rapport technique de l'OCDE du 11 juin 1976 «Méthode proposée pour la détermination de la biodégradabilité des agents tensio-actifs utilisés dans les détergents synthétiques», et contient en plus du phosphate dipotassique.

▼M6

18. On peut également choisir de stériliser les composants du milieu séparément avant le stockage, ou d'ajouter la peptone et l'extrait de viande peu avant d'entamer l'essai. Préalablement à toute utilisation, le milieu sera soigneusement mélangé et son pH ajusté à 7,5 ± 0,5, s'il y a lieu.

Substance chimique d'essai

19. Une solution mère est préparée pour les substances chimiques d'essai facilement hydrosolubles, à une concentration n'excédant pas la limite de solubilité dans l'eau (pour éviter toute précipitation). Les produits peu solubles dans l'eau, les mélanges dont les composants présentent différentes solubilités aqueuses et les substances adsorbantes sont pesés directement dans le récipient d'essai. Dans ces cas, le recours à des solutions mères peut constituer une option valable si les concentrations des solutés étudiés dans les récipients d'essai sont analysées (avant l'ajout de la boue activée). Si l'on prépare des fractions solubilisées dans l'eau [water accomodated fractions] (WAF), il est également essentiel de titrer la solution dans les récipients pour les différentes substances d'essai. On évitera d'employer des solvants organiques ou des dispersants/émulsifiants pour améliorer la solubilité. Il est possible de traiter les solutions mères aux ultrasons et d'agiter les suspensions préalablement, par exemple la nuit précédente, si la stabilité de la substance chimique d'essai dans ces conditions est attestée par des données pertinentes.

20. La substance chimique d'essai est susceptible d'affecter le pH du dispositif d'essai. Avant de procéder à l'essai, il convient donc de déterminer le pH de mélanges ayant reçu la même substance, au cours d'un essai préliminaire visant à s'assurer de l'opportunité d'un ajustement du pH préalablement à l'essai principal, puis le jour de son déroulement. Les solutions/suspensions aqueuses de la substance chimique d'essai sont neutralisées avant l'ajout de l'inoculum, s'il y a lieu. Cependant, cette neutralisation étant susceptible de modifier les propriétés chimiques de la substance étudiée, des essais supplémentaires sont envisageables, selon la finalité de l'étude, afin d'évaluer l'effet de la substance chimique d'essai sur la boue quand le pH n'est pas ajusté.

21. La toxicité des substances chimiques volatiles, en particulièrement dans les dispositifs d'essai avec barbotage, peut varier en intensité en raison de pertes de substance pendant la période d'exposition. La prudence est donc de mise avec de telles espèces, ce qui se traduit par l'analyse spécifique des composés en question dans des mélanges témoins, et par une modification du régime d'aération.

Substance chimique de référence

22. Si le 3,5-dichlorophénol sert de substance de référence, une dilution est préparée avec 1,00 g de 3,5- dichlorophénol dans 1 000 ml d'eau (15). La dissolution est accélérée par un traitement aux ultrasons ou une température de l'eau élevée, la solution n'étant portée à son volume final qu'après refroidissement à température ambiante. Il convient toutefois de s'assurer que la structure de la substance de référence n'est pas modifiée. Le pH de la solution est vérifié et ajusté à pH 7 — 8, le cas échéant, avec NaOH ou H_2SO_4.

23. Si le sulfate de cuivre (II) pentahydraté sert de référence, il est préparé dans des solutions concentrées à 58 mg/l, 100 mg/l et 180 mg/l (facteur de 1,8). La substance est pesée directement dans les récipients d'essai (29, 50 et 90 mg respectivement dans des récipients de 500 ml). Elle est ensuite dissoute dans 234 ml d'eau du robinet stérilisée par autoclave. Le sulfate de cuivre (II) pentahydraté se dissout facilement. Une fois l'essai lancé, on ajoute 16 ml d'eau usée reconstituée et 250 ml de boue activée.

▼M6

Inhibiteur spécifique de la nitrification

24. On prépare une solution mère de N-allylthiourée (ATU) concentrée à 2,32 g/l. Si l'on ajoute 2,5 ml de cette solution mère dans un mélange d'incubation de volume final 500 ml, la concentration résultante d'ATU est alors de 11,6 mg/l (10^{-4} mol/l), une teneur suffisante (4) pour inhiber 100 % de la nitrification dans une boue activée nitrifiante contenant 1,5 g/l de solides en suspension.

Témoin abiotique

25. Dans certaines conditions peu fréquentes, une substance chimique d'essai fortement réductrice peut entraîner une consommation d'oxygène abiotique quantifiable. Des témoins abiotiques sont alors nécessaires pour distinguer la consommation d'oxygène abiotique due à la substance d'essai et la respiration microbienne. Les témoins abiotiques peuvent avoir la même composition que les mélanges d'essai à l'exception de l'inoculum. De façon similaire, il est possible d'inclure des témoins abiotiques dépourvus d'inoculum lors de l'analyse de la concentration obtenue pendant la phase d'exposition de l'essai. C'est notamment le cas lorsqu'on a fait appel à des solutions mères de substances peu hydrosolubles avec des composés présentant des solubilités aqueuses différentes. Certains cas particuliers peuvent exiger la préparation d'un témoin abiotique contenant un inoculum stérilisé (par exemple par autoclave, ou par ajout d'agents toxiques stérilisants). Certaines substances chimiques sont susceptibles de synthétiser ou de consommer de l'oxygène, à condition que l'interface réactionnelle soit suffisamment importante, même si elles nécessitent normalement une température ou une pression bien supérieure pour que la réaction ait lieu. À cet égard, les substances de type peroxy feront l'objet d'une attention particulière. Un inoculum stérilisé présente une importante aire superficielle.

Inoculum

26. Pour une utilisation courante, la boue activée est collectée à la sortie, ou près de la sortie, du bassin d'aération d'une station d'épuration fonctionnelle traitant essentiellement des eaux usées domestiques. En fonction de la finalité de l'essai, on peut aussi envisager d'employer d'autres types ou sources de boue activée adaptés, par exemple de la boue reconstituée en laboratoire, avec une concentration de solides en suspension située entre 2 g/l et 4 g/l. Les boues issues de différentes stations d'épuration sont cependant susceptibles de présenter des caractéristiques et sensibilités différentes.

27. La boue peut être utilisée telle quelle, mais les particules grossières seront éliminées en laissant reposer la boue entre 5 et 15 minutes, par exemple, afin de séparer la fraction supérieure contenant les particules fines après décantation ou tamisage (tamis de maille 1 mm^2, par exemple). Une autre option consiste à homogénéiser la boue au mixer pendant environ 15 secondes ou plus, mais la prudence est alors de mise dans la mesure où un mixage trop long peut se traduire par des variations de température et des forces de cisaillement.

28. Il est souvent nécessaire de laver la boue, notamment quand le taux de respiration endogène est faible. Pour cela, la boue est d'abord centrifugée suffisamment longtemps pour faire apparaître un surnageant clair et des culots de résidus solides d'épuration, par exemple 10 minutes à environ 10 000 m/s^2. La phase liquide surnageante est éliminée, puis la boue est remise en suspension par agitation dans de l'eau du robinet non chlorée. Cette eau de lavage est alors éliminée par centrifugation, comme précédemment. Si nécessaire, les étapes de lavage et de centrifugation sont répétées. On détermine le poids sec compris dans un volume donné de boue (constituée des solides remis en suspension), laquelle est alors concentrée par élimination de la fraction liquide ou au contraire diluée dans de l'eau du robinet non chlorée de façon à obtenir la concentration de solides requise,

▼M6

soit 3 g/l. La boue activée est aérée en continu (par exemple au débit de 2 l/min) à la température de l'essai et, si possible, utilisée le jour même de sa collecte. Dans le cas contraire, la boue est alimentée quotidiennement avec une eau usée reconstituée (50 ml d'eau usée reconstituée par litre de boue activée) pendant deux jours supplémentaires. On soumet alors la boue à l'essai, dont les résultats sont considérés comme valides si aucune variation significative de l'activité de la boue n'a été observée, d'après les taux de respiration hétérotrophe d'une part, et de respiration liée à la nitrification d'autre part.

29. Pendant l'incubation, l'apparition d'une mousse suffisamment abondante pour transporter les particules et déborder du récipient d'aération peut causer des difficultés. C'est parfois simplement la présence de l'eau usée reconstituée qui occasionne la formation de mousse, mais ce phénomène devrait être anticipé si la substance chimique d'essai présente des propriétés tensio-actives ou contient un tensio-actif. La perte de résidus solides de la boue dans le mélange d'essai se traduit par des taux de respiration artificiellement réduits, susceptibles d'être faussement interprétés comme l'effet d'une inhibition. En outre, l'aération d'une solution de tensio-actifs concentre ces composés dans la couche de mousse; si celle-ci est éliminée du dispositif d'essai, les concentrations d'exposition sont alors plus faibles. Ce moussage est maîtrisable à l'aide de méthodes mécaniques simples (par exemple en agitant le mélange à la main avec — une barre de verre, de temps en temps) ou en ajoutant une émulsion siliconée sans tensio-actifs contenant un agent antimoussant et/ou en choisissant un type d'aération par agitation des flacons. Si le problème est lié à la présence d'eau usée reconstituée, la composition de cette dernière est modifiée par ajout d'un agent antimoussant à une proportion de 50µl/l,par exemple. Lorsque c'est la substance chimique d'essai qui est à l'origine du moussage, la quantité nécessaire à l'effondrement de la mousse est déterminée pour la concentration maximale, chaque récipient étant ensuite traité avec cette même quantité (y compris ceux qui ne contiennent pas de mousse, comme les témoins à blanc et les récipients de référence). L'agent antimoussant éventuellement employé ne devrait pas interagir avec l'inoculum et/ou la substance d'essai.

MODE OPÉRATOIRE

30. L'inhibition peut être quantifiée pour trois types de consommation d'oxygène: totale, hétérotrophe et liée à la nitrification. La mesure de la consommation d'oxygène totale est généralement suffisante. Néanmoins, il convient de déterminer les effets sur la consommation d'oxygène hétérotrophe liée à l'oxydation du carbone organique d'une part, et à l'oxydation de l'ammonium d'autre part, lorsque certaines substances spécifiques exigent l'évaluation de ces deux critères supplémentaires ou (le cas échéant) pour expliquer des courbes dose-effet atypiques en matière d'inhibition de la consommation d'oxygène totale.

Conditions d'essai

31. L'essai est mené à une température de 20 ± 2 °C.

Mélanges d'essai

32. Les mélanges d'essai (notés flacons F_T au tableau 1) contenant de l'eau, de l'eau usée reconstituée et la substance chimique d'essai, sont préparés de façon à obtenir différentes concentrations nominales de la substance chimique d'essai (voir au tableau 1 des exemples de volume des composants). Le pH est ajusté à 7,5 ± 0,5, s'il y a lieu; on dilue les mélanges avec de l'eau et on ajoute de l'inoculum pour obtenir les mêmes volumes finals dans les récipients et ensuite lancer l'aération.

Mélanges de référence

33. La préparation des mélanges de référence (notés F_R) est la même que celle des mélanges d'essai, la substance chimique d'essai étant remplacée par la substance chimique de référence, par exemple le 3,5-dichlorophénol.

▼M6

Témoins à blanc

34. Les témoins à blanc (notés F_B) sont préparés au début et à la fin de la période d'exposition dans les essais pour lesquels les béchers sont mis en place en série, à intervalles réguliers. Pour les systèmes d'essai faisant appel à un équipement permettant de quantifier simultanément différentes consommations d'oxygène, on inclura au moins deux témoins à blanc dans chaque lot d'analyse simultanée. Les témoins à blanc contiennent un volume égal de boue activée et de milieu reconstitué, mais sont exempts de substance chimique d'essai ou de référence. Le volume d'eau dilution est le même pour les mélanges témoins, d'essai et de référence.

Témoin abiotique

35. Lorsque cela est nécessaire, notamment pour une substance chimique d'essai fortement réductrice ou soupçonnée de présenter de telles propriétés, on préparera un mélange F_A afin de mesurer la consommation d'oxygène abiotique. Ce mélange présentera les mêmes quantités de substance chimique d'essai et d'eau usée reconstituée et le même volume que les mélanges d'essai, mais ne contiendra pas de boue activée.

Procédure générale et mesures

36. Les mélanges d'essai et de référence ainsi que les témoins à blanc et abiotiques sont incubés à la température d'essai en conditions d'aération forcée (0,5 - 1 l/min) de manière à maintenir une concentration d'oxygène dissous supérieure à 60 - 70 % de la saturation, et assurer la dispersion correcte des flocons de boue. Il est aussi nécessaire d'agiter les cultures pour maintenir les flocons de boue en suspension. On considère que l'incubation débute à l'instant où l'inoculum de la boue activée entre en contact avec les autres constituants du mélange final. À la fin de l'incubation, c'est-à-dire à l'issue d'une période d'exposition généralement fixée à 3 heures, on retire les échantillons pour mesurer la vitesse de diminution de la concentration d'oxygène dissous dans la cellule prévue à cet effet (graphique 2 de l'Appendice 3) ou dans un flacon DBO entièrement rempli. La façon dont les incubations commencent dépend aussi de la capacité de l'équipement choisi de mesurer les taux de consommation d'oxygène. Par exemple, si l'équipement comprend une seule sonde à oxygène, les mesures sont réalisées individuellement. Dans ce cas, on préparera les différents mélanges nécessaires à l'essai avec eau usée reconstituée sans y ajouter l'inoculum, les quantités de boue appropriées n'étant ajoutées qu'ensuite dans chaque récipient de la série. Les incubations sont donc lancées successivement aux intervalles adéquats, par exemple toutes les 10 à 15 minutes. Inversement, le dispositif de mesure peut comprendre plusieurs sondes facilitant les mesures multiples en parallèle; dans ce cas, l'inoculum peut être ajouté au même moment dans les groupes de récipients appropriés.

37. La concentration nominale de solides en suspension dans la boue activée est de 1,5 g/l dans tous les mélanges d'essai, de référence et les témoins à blanc (mais pas dans le témoin abiotique). La consommation d'oxygène est mesurée après 3 heures d'exposition. Le cas échéant, il est envisageable de réaliser les mesures après 30 minutes d'exposition supplémentaires, dans les conditions détaillées au paragraphe 5.

Pouvoir nitrifiant de la boue

38. Les éventuelles propriétés nitrifiantes de la boue seront mises en lumière et, le cas échéant, quantifiées à l'aide de mélanges (F_B) similaires à ceux du témoin à blanc et des autres mélanges témoins (F_N), avec pour composant

▼M6

supplémentaire la N-allylthiourée à 11,6 mg/l. Ces mélanges seront aérés et incubés à 20° ± 2 °C pendant 3 heures. On calculera alors les taux de consommation d'oxygène, dont on déduira le taux de consommation d'oxygène liée à la nitrification.

Modèles d'essai

Essai de détermination de l'ordre de grandeur

39. Il pourra être nécessaire de réaliser un essai préliminaire pour estimer l'ordre de grandeur des concentrations de substance d'essai à utiliser dans l'essai final d'inhibition de la consommation d'oxygène. Inversement, l'absence d'inhibition de la consommation d'oxygène par la substance étudiée lors de l'essai préliminaire peut démontrer que l'essai final est inutile. Cependant, des tripliquats présentant la concentration d'essai la plus élevée de celles utilisées dans l'essai préliminaire (généralement 1 000 mg/l, cette valeur dépendant toutefois des spécifications de l'équipement) sont inclus.

Tableau

Exemples de mélanges destinés à l'essai préliminaire

Réactifs	Concentration d'origine				
Solution mère de la substance chimiqued'essai	10 g/l				
Solution mère de milieu reconstitué	Voir paragraphe 16				
Suspension mère de boue activée	3 g/l de solides en suspension				
Composants des mélanges	Quantité dans les récipients d'essai [a]				
	F_{T1}	F_{T2}	F_{T3-5}	F_{B1-2}	F_A
Solution mère de la substance chimiqued'essai (ml) (paragraphes 19 à 21)	0,5	5	50	0	50
Solution mère de milieu reconstitué (ml) (paragraphe 16)	16	16	16	16	16
Suspension de boue activée (ml) (paragraphes 26 à 29)	250	250	250	250	0
Eau (paragraphe 15)	233,5	229	184	234	434
Volume total des mélanges (ml)	500	500	500	500	500
Concentrations dans le mélange					
Suspension d'essai (mg/l) Boue activée	10	100	1 000	0	1 000
(solides en suspension) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

[a] La même procédure sera suivie avec les substances chimiques de référence, pour préparer les flacons F_{R1-3}

40. L'essai comprendra au moins trois concentrations de la substance chimique étudiée, par exemple 10 mg/l, 100 mg/l et 1 000 mg/l avec un témoin à blanc et, si nécessaire, au moins trois témoins abiotiques à la concentration de substance chimique d'essai maximum (voir un exemple tableau 1). Dans l'idéal, la concentration la plus basse employée ne devrait pas avoir d'effet

▼M6

sur la consommation d'oxygène. S'il y a lieu, on calculera les taux de consommation d'oxygène et le taux de nitrification, puis le pourcentage d'inhibition. En fonction de l'objectif de l'essai, il est aussi possible de déterminer simplement la toxicité d'une concentration limite, par exemple 1 000 mg/l. Si aucune toxicité n'est révélée de façon statistiquement significative à cette concentration, il ne sera pas nécessaire de réaliser de nouveaux essais à des concentrations supérieures ou inférieures. Il convient de noter que les produits peu solubles dans l'eau, les mélanges dont les composants présentent différentes solubilités aqueuses et les substances adsorbantes sont pesés directement dans le récipient d'essai. Dans ce cas, le volume réservé à la solution mère de la substance d'essai sera remplacé par de l'eau de dilution.

Essai final

Inhibition de la consommation d'oxygène totale

41. La série de concentrations utilisée pour l'essai découle des résultats de l'essai préliminaire. Pour obtenir une CSEO et une CE_x (par exemple CE_{50}), il est recommandé, dans la plupart des cas, d'utiliser six témoins et cinq concentrations d'essai suivant une série géométrique, avec cinq répliquats. Le témoin abiotique n'a pas besoin d'être répété si l'essai préliminaire n'a révélé aucune consommation d'oxygène significative. Dans le cas contraire, il convient d'inclure des témoins abiotiques pour chaque concentration de substance chimique d'essai. La sensibilité de la boue est évaluée à l'aide d'une substance de référence, le 3,5- dichlorophénol. Cette évaluation est effectuée sur chacune des séries de l'essai dans la mesure où la sensibilité est connue pour fluctuer. Dans tous les cas, on prélève des échantillons dans les récipients d'essai au bout de 3 heures, ou 3 heures et demie s'il y a lieu, afin de mesurer le taux de consommation d'oxygène dans la cellule équipée d'une électrode à oxygène. Les taux de respiration respectifs des mélanges témoins et expérimentaux sont déduits des valeurs collectées, et le pourcentage d'inhibition est calculé d'après l'équation 7 ci-après.

Distinction entre l'inhibition de respiration hétérotrophe et la nitrification

42. En recourant à un agent qui inhibe spécifiquement la nitrification, l'ATU, il est possible d'évaluer directement l'effet inhibiteur d'une substance chimique d'essai sur l'oxydation hétérotrophe. Par ailleurs, en soustrayant le taux de consommation d'oxygène en présence d'ATU au taux de consommation d'oxygène total (sans ATU), il est possible de déduire l'impact sur le taux de nitrification. Deux séries de mélanges réactionnels sont préparées conformément aux protocoles de détermination des CE_x ou CSEO décrits au paragraphe 41, avec toutefois un composant supplémentaire, l'ATU, qu'il convient d'ajouter à chaque mélange d'une des deux séries de manière à obtenir une concentration finale de 11,6 mg/L, dont il a été démontré qu'elle inhibe complètement la nitrification dans les boues contenant des concentrations de solides en suspension pouvant aller jusqu'à 3 000 mg/l (4). Les taux de consommation d'oxygène sont mesurés à l'issue de la période d'exposition; ces valeurs directes représentent uniquement la respiration hétérotrophe, les différences entre ces résultats et les taux de respiration totale associés correspondant à la nitrification. On calcule alors les différents degrés d'inhibition.

Mesures

43. Après la ou les périodes d'exposition, un échantillon prélevé dans le premier récipient aéré est transféré dans la cellule équipée d'une électrode à oxygène (graphique 1 de l'Appendice 2) pour une mesure immédiate de la concentration en oxygène dissous. Si l'on dispose d'un système à plusieurs électrodes, ces mesures peuvent être effectuées simultanément. Il est essentiel d'agiter (à l'aide d'un barreau aimanté inerte) à la même vitesse que celle appliquée lors de l'étalonnage de l'électrode de manière à assurer une réponse rapide de la sonde aux variations de concentration d'oxygène, et

▼M6

pour garantir la régularité et la reproductibilité de ces mesures dans la cellule. En général, un système comprenant une électrode à oxygène auto-agitatrice convient parfaitement. La cellule est rincée à l'eau entre chaque mesure. Une autre solution consiste à placer l'échantillon dans un flacon DBO (graphique 2 de l'Appendice 3) équipé d'un agitateur magnétique. Une sonde à oxygène équipée d'un adaptateur est alors introduite par le col du flacon, puis l'agitation est lancée. Dans les deux cas, il convient de mesurer et d'enregistrer la concentration d'oxygène dissous en continu pendant une période de 5 à 10 minutes, en général, ou jusqu'à ce que cette concentration chute en deçà de 2 mg/L. L'électrode est alors retirée et l'échantillon reversé dans le récipient d'essai où l'aération et l'agitation se poursuivent si une mesure est nécessaire après une plus longue période d'exposition.

Vérification de la concentration de la substance chimique d'essai

44. Dans certains cas, il peut être nécessaire de mesurer la concentration de la substance chimique d'essai directement dans le récipient d'essai. Il convient de noter que si l'on utilise des solutions mères de:

— substances peu hydrosolubles,

— mélanges dont les composants présentent différentes solubilités aqueuses, ou

— substances bien solubles dans l'eau mais dont la solution mère offre une concentration proche de la limite de saturation,

la fraction dissoute est inconnue, et la concentration réelle de la substance chimique étudiée transférée dans les récipients d'essai demeure indéterminée. Il est nécessaire d'analyser les concentrations de la substance chimique d'essai dans les récipients afin de caractériser l'exposition. Pour des raisons de simplicité, cette analyse est réalisée avant d'ajouter l'inoculum. Dans la mesure où seules les fractions dissoutes sont transférées dans les récipients d'essai, les concentrations mesurées peuvent s'avérer très faibles.

45. Il est recommandé de peser directement la substance chimique étudiée dans les récipients d'essai et de s'appuyer sur la concentration nominale initiale correspondant à cette masse dans les calculs suivants, pour éviter des analyses coûteuses et chronophages. La distinction entre les fractions dissoute, non dissoute et adsorbée de la substance d'essai est inutile puisque toutes ces fractions sont également présentes en pratique dans les stations d'épuration, et qu'elles peuvent varier selon la composition des eaux usées. L'objectif de la présente méthode d'essai est de produire une estimation réaliste de la concentration non inhibitrice; elle ne convient pas pour étudier en détail quelles fractions contribuent à l'inhibition des organismes des boues activées. Enfin, les substances adsorbantes seront également pesées directement dans les récipients d'essai. On utilisera en outre de la verrerie silanisée pour limiter les pertes par adsorption.

RÉSULTATS ET RAPPORTS

Calcul des taux de consommation d'oxygène

46. Les taux de consommation d'oxygène sont calculés à partir de la moyenne des valeurs relevées, par exemple en utilisant la partie linéaire des courbes de concentration d'oxygène en fonction du temps, les calculs étant limités aux concentrations situées entre 2,0 mg/l et 7,0 mg/l, dans la mesure où des teneurs en oxygène supérieures ou inférieures sont susceptibles d'influencer la consommation. Il est cependant parfois inévitable et nécessaire de

▼M6

travailler avec des valeurs situées en dehors de cette fourchette, notamment quand la respiration est fortement inhibée et donc très lente, ou lorsqu'une boue activée respire très rapidement. Cette démarche est acceptable à condition que les parties de la courbe de consommation considérées soient linéaires et que leurs gradients ne varient pas aux limites de l'intervalle 2,0 mg/l – 7,0 mg/l d'O_2. Toute partie non linéaire de la fonction traduit une stabilisation du système de mesure ou une modification du taux de consommation, et ne devrait donc pas être utilisée pour calculer des taux de respiration. Le taux de consommation d'oxygène est exprimé en milligrammes par litre et par heure (mg/lh) ou en milligrammes par gramme de boue sèche et par heure (mg/gh). Le taux de consommation d'oxygène, R, en mg/lh, peut être déduit ou interpolé à partir de la partie linéaire de la courbe de quantité d'oxygène décroissante, d'après l'équation 1:

$$R = (Q_1 - Q_2)/\Delta_t \times 60 \qquad (1)$$

où

Q_1 est la concentration d'oxygène au début de la partie de courbe linéaire sélectionnée (mg/l);

Q_2 est la concentration d'oxygène à la fin de la partie de courbe linéaire sélectionnée (mg/l);

Δ_t est l'intervalle de temps entre ces deux mesures (min).

47. Le taux de respiration spécifique (R_s) est exprimé comme la quantité d'oxygène consommée par gramme de boue sèche et par heure (mg/gh), d'après l'équation 2:

$$R_s = R/SS \qquad (2)$$

où SS est la concentration des solides en suspension dans le mélange d'essai (g/l).

48. R peut être précisé par divers indices aux significations suivantes

S taux spécifique

T taux de respiration totale

N taux de respiration liée à la nitrification

H taux de respiration hétérotrophe

A taux correspondant aux processus abiotiques

B taux des essais à blanc (moyenne)

Calcul du taux de consommation d'oxygène liée à la nitrification

49. La relation entre la respiration totale (R_T), la respiration liée à la nitrification (R_N) et la respiration hétérotrophe (R_H) est fournie par l'équation 3:

$$R_N = R_T - R_H \qquad (3)$$

où

R_N est le taux de consommation d'oxygène liée à la nitrification (mg/lh);

R_T est le taux mesuré de consommation d'oxygène du témoin à blanc (sans ATU; F_B) (mg/lh).

R_H est le taux mesuré de consommation d'oxygène du témoin à blanc avec ATU (F_N) (mg/lh).

▼M6

50. Cette équation demeure valable pour les valeurs des témoins à blanc (R_{NB}, R_{TB}, R_{HB}), des témoins abiotiques (R_{NA}, R_{TA}, R_{HA}) et des essais avec la substance chimique étudiée (R_{NS}, R_{TS}, R_{HS}) (mg/gh). Les taux de respiration spécifiques sont déduits de la manière suivante:

$$R_{NS} = R_N/SS \quad (4)$$

$$R_{TS} = R_T/SS \quad (5)$$

$$R_{HS} = R_H/SS \quad (6)$$

51. Si R_N n'est pas significatif (par exemple < 5 % du R_T des témoins à blanc) dans l'essai préliminaire, on peut supposer que la consommation d'oxygène hétérotrophe est égale à la consommation totale et qu'aucune nitrification ne se produit. Si l'essai doit prendre en compte les effets sur les microorganismes hétérotrophes et nitrifiants, une autre source de boue activée est nécessaire. L'essai final n'est mis en œuvre qu'en cas de variation de l'inhibition du taux de consommation d'oxygène en fonction des concentrations de la substance chimique étudiée.

Calcul du pourcentage d'inhibition

52. Le pourcentage d'inhibition de la consommation d'oxygène totale, I_T, déterminé pour chaque concentration de la substance chimique d'essai, est calculé d'après l'équation 7:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100\ \% \quad (7)$$

53. De la même façon, le pourcentage d'inhibition de la consommation d'oxygène hétérotrophe, I_H, déterminé pour chaque concentration de la substance chimique d'essai, est calculé d'après l'équation 8:

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA})/R_{HB}] \times 100\ \% \quad (8)$$

54. Enfin, l'inhibition de la consommation d'oxygène liée à la nitrification, I_N, déterminée pour chaque concentration de la substance d'essai, est calculée d'après l'équation 9:

$$I_N = [1 - (R_T - R_H)/(R_{TB} - R_{HB})] \times 100\ \% \quad (9)$$

55. On tracera la courbe du pourcentage d'inhibition de la consommation d'oxygène en fonction du logarithme de la concentration de substance chimique d'essai (désignée courbe d'inhibition, voir graphique 3 de l'Appendice 4). Les courbes d'inhibition sont tracées pour chaque phase d'aération de 3 h, ou après 30 min supplémentaires. La concentration de la substance chimique d'essai correspondant à une inhibition de 50 % de la consommation d'oxygène (CE_{50}) est calculée ou interpolée à partir de cette courbe. Si les données nécessaires sont disponibles, on calculera ou interpolera aussi les limites de confiance à 95 % de la CE_{50}, la pente de la courbe et les valeurs pertinentes représentant le début de l'inhibition (par exemple, CE_{10} ou CE_{20}) et sa fin (par exemple, CE_{80} ou CE_{90}).

56. Il convient de noter qu'en raison de la fréquente variabilité des résultats observée, il suffit, dans de nombreux cas, d'exprimer les concentrations par ordre de grandeur, par exemple:

CE_{50} < 1 mg/l

CE_{50} 1 mg/l à 10 mg/l

CE_{50} 10 mg/l à 100 mg/l

CE_{50} > 100mg/l

Interprétation des résultats

CE_x

▼M6

57. On calcule les valeurs de CE_x et leurs limites de confiance à 95 % supérieures et inférieures correspondant au paramètre en utilisant des méthodes statistiques adéquates [par exemple, analyse probit, fonction logistique ou de Weibull, méthode simplifiée de Spearman-Karber ou simple interpolation (11)]. Une CE_x est obtenue en intégrant une valeur correspondant à x % de la moyenne du témoin dans l'équation retenue. Pour calculer la CE_{50} ou tout autre CE_x, il faut soumettre les moyennes par traitement (X) à une analyse de régression.

Estimation de la CSEO

58. Lorsqu'une analyse statistique est appliquée pour déterminer la CSEO, il faut disposer de statistiques par récipient (chaque récipient individuel étant considéré comme une expérience distincte). Il convient alors d'utiliser des méthodes statistiques adéquates conformément au Document d'orientation de l'OCDE intitulé Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application (11). En général, les effets indésirables de la substance chimique d'essai par rapport au témoin sont étudiés en procédant à une vérification de l'hypothèse unilatérale (plus faible) pour $p \leq 0{,}05$.

Rapport d'essai

59. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Substance chimique d'essai

— nom courant, nom chimique, numéro CAS, pureté;

— propriétés physico-chimiques de la substance chimique d'essai (par exemple log K_{oe}, hydrosolubilité, pression de vapeur, constante de Henry (H) et information éventuelle sur le devenir de la substance chimique d'essai, p. ex. adsorption sur la boue activée);

Système d'essai

— source, conditions de fonctionnement de la station d'épuration et nature des effluents traités, concentration, prétraitement et maintenance de la boue activée;

Conditions d'essai

— température et pH de l'essai, durée de la ou des phase(s) d'exposition;

Résultats

— consommation d'oxygène spécifique des témoins (mg d'O2/(g boue × h);

— ensemble des données collectées, courbe(s) d'inhibition et méthode de calcul de la CE50;

— CE50 et, si possible, intervalle de confiance à 95 %, le cas échéant CE20, CE80; éventuellement CSEO et méthodes statistiques employées, si la CE50 ne peut être déterminée;

— résultats de l'inhibition totale, et, s'il y a lieu, des inhibitions hétérotrophes et liée à la nitrification;

— consommation d'oxygène abiotique dans le témoin physico-chimique (le cas échéant);

— nom des substances chimiques de référence et résultats obtenus avec ces substances;

— tout écart par rapport à la procédure normalisée ou toute observation susceptible d'influencer le résultat.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Brown, D., Hitz, H.R. et Schäfer, L. (1981), The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test. *Chemosphere* 10 (3): 245-261.

▼**M6**

(2) King, E. F. et Painter H. A. (1986). Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results. *Toxicity Assessment* 1(1): 27-39.

(3) OCDE (1984) Boue activée, essai d'inhibition de la respiration, ligne directrice n° 209 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.

(4) ISO (2007). Norme ISO 8192 (1986), Qualité de l'eau. Essai d'inhibition de la consommation d'oxygène par des boues activées pour l'oxydation du carbone et de l'ammonium, Organisation internationale de normalisation.

(5) Bealing, D. J. (2003) Document ISO/TC147/WGI/N.18, Organisation internationale de normalisation.

(6) Painter, H A, Jones K (1963). The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-organisms, *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471-483.

(7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge, *Toxicity Assessment* 1:515-524.

(8) Robra, B. (1976), Wasser/Abwasser 117, 80.

(9) Fiebig S. and Noack, U. (2004). The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test, acc. to the OECD guideline 209, *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556-1557.

(10) ISO (1995). ISO 10634 Qualité de l'eau — Lignes directrices pour la préparation et le traitement des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux, Organisation internationale de normalisation.

(11) OCDE (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a guidance to application, Série de l'OCDE sur les essais et l'évaluation N° 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OCDE, Paris.

▼**M6**

Appendice 1

Définitions

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente méthode d'essai:

Substance chimique: une substance ou un mélange

CE_x (concentration efficace à x %): concentration qui engendre un effet de x % sur les organismes d'expérience durant une période d'exposition déterminée, en comparaison avec un témoin. Par exemple, une CE_{50} est une concentration estimée produire un effet sur un paramètre évalué de l'essai dans 50 % d'une population exposée durant une période d'exposition déterminée.

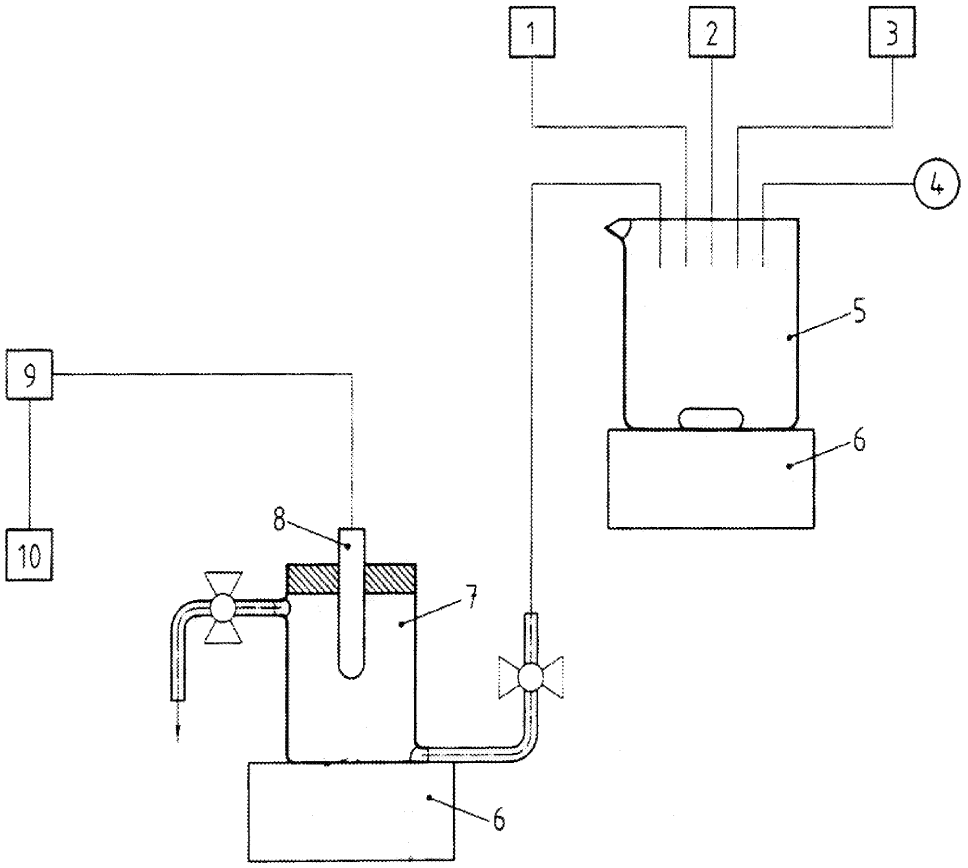
CSEO (concentration sans effet observé): concentration de la substance chimique d'essai à laquelle aucun effet n'est observé. Dans cet essai, la concentration correspondant à la CSEO n'a pas d'effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) durant une période d'exposition donnée, en comparaison avec le témoin.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼**M6**

Appendice 2

Graphique 1: **Exemple de dispositif de mesure**



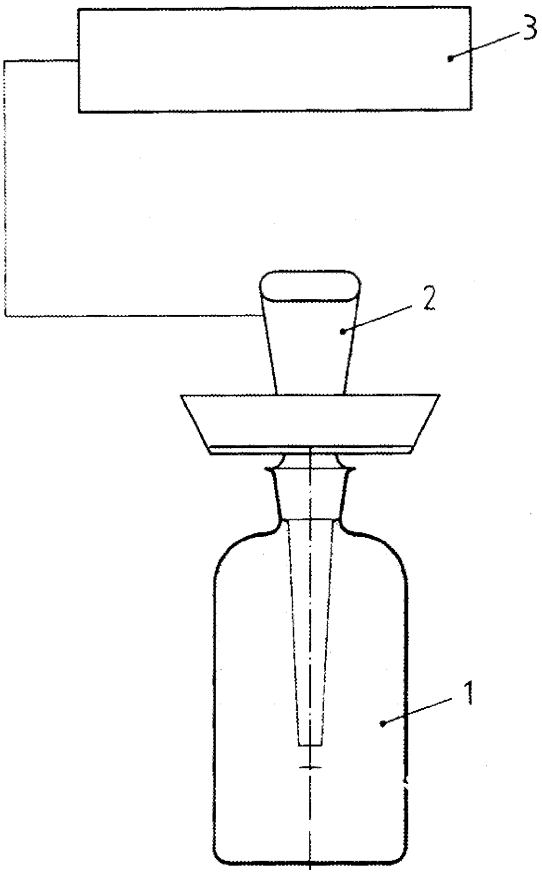
Légende

1	boue activée	6	agitateur magnétique
2	milieu reconstitué	7	cellule de mesure de l'oxygène
3	Substance chimique d'essai	8	électrode à oxygène
4	air	9	instrument de mesure de l'oxygène
5	bécher du mélange	10	dispositif d'enregistrement

▼**M6**

Appendice 3

Graphique 2: **Exemple de dispositif de mesure avec flacon DBO**



Légende

1 récipient d'essai

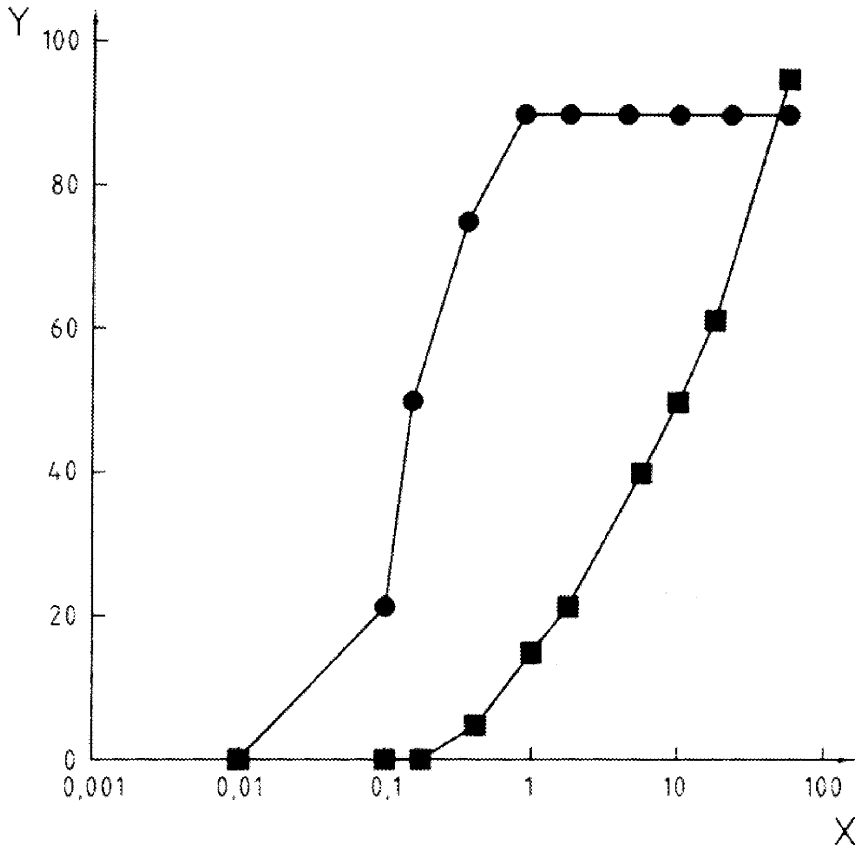
2 électrode à oxygène

3 instrument de mesure de l'oxygène

▼**M6**

Appendice 4

Graphique 3: **Exemple de courbes d'inhibition**



Légende

X concentration de 3,5-dichlorophénol (mg/l)

Y inhibition (%)

■ inhibition de la respiration hétérotrophe avec une boue nitrifiante

● inhibition de la nitrification avec une boue nitrifiante.

▼B

C. 12. **BIODÉGRADATION**

TEST S.C.A.S. MODIFIÉ

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Le but de la méthode est de mesurer la biodégradabilité totale potentielle de composés organiques non volatils et solubles dans l'eau, lorsqu'ils sont exposés à des concentrations relativement élevées de micro-organismes pendant une longue période. La viabilité des micro-organismes est maintenue tout au long de cette période par un apport journalier d'eaux résiduaires décantées. (Pendant le week-end, les eaux résiduaires peuvent être stockées à 4 ^{o}C. Les eaux résiduaires synthétiques de l'essai de confirmation de l'OCDE peuvent également être utilisées.)

Une adsorption physico-chimique sur les particules solides en suspension peut se produire et doit être prise en considération lors de l'interprétation des résultats (voir 3.2).

Étant donné la longue période de rétention de la phase aqueuse (36 heures) et l'ajout régulier de substances nutritives, l'essai n'est pas une simulation des conditions rencontrées dans une station d'épuration des eaux usées. Les résultats obtenus avec diverses substances d'essai indiquent que cet essai a un potentiel élevé de biodégradation.

Les conditions dans lesquelles se déroule l'essai facilitent la sélection et/ou l'acclimatation de micro-organismes susceptibles de dégrader la solution d'essai (la procédure peut également être utilisée en vue de préparer un inoculum acclimaté pour d'autres essais).

Dans cette méthode, on mesure la concentration de carbone organique dissous (COD) pour évaluer la biodégradabilité finale des substances d'essai. Il est préférable de déterminer le COD après acidification et purge plutôt qu'en établissant la différence C_{total}—$C_{minéral}$.

Le recours simultané à une analyse spécifique permet de déterminer la biodégradabilité primaire de la substance (disparition de la structure chimique initiale).

La méthode n'est applicable qu'aux substances organiques qui, à la concentration d'essai:

— sont solubles dans l'eau (au moins 20 mg de COD par litre),

— ont une pression de vapeur négligeable,

— n'ont pas d'effet inhibiteur vis-à-vis des bactéries,

— ne font pas l'objet d'une adsorption importante au cours de l'essai,

— ne sont pas éliminées par moussage de la solution d'essai.

La teneur en carbone organique de la substance d'essai doit être déterminée.

▼B

Il est utile de connaître les proportions relatives des principaux éléments constitutifs de la substance d'essai pour interpréter les résultats obtenus, notamment lorsque ceux-ci sont peu élevés ou marginaux.

Il est souhaitable de connaître le seuil de toxicité de la substance vis-à-vis des micro-organismes pour interpréter les résultats peu élevés et pour choisir les concentrations d'essai appropriées.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

C_T = concentration de la substance d'essai en carbone organique contenu dans ou ajouté à l'effluent décanté au début de la période d'aération (mg par litre)

C_t = concentration en COD du liquide surnageant de la substance d'essai à la fin de la période d'aération (mg par litre)

C_c = concentration en COD du liquide surnageant du témoin à la fin de la période d'aération (mg par litre)

Dans cette méthode, la biodégradation est déterminée par la disparition du carbone organique. La dégradation biotique peut être exprimée en:

1) pourcentage d'élimination de D_{da} de l'apport journalier de la substance:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad (1)$$

où:

D_{da} = dégradation/apport journalier;

2) pourcentage d'élimination des substances présentes en début de journée:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2(a)]$$

$$= \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2(b)]$$

où:

D_{ssd} = dégradation/substance en début de journée.

Les facteurs i et (i + 1) se réfèrent au jour où la mesure a été effectuée.

Il est recommandé d'utiliser l'équation 2(a) si l'effluent COD varie d'un jour à l'autre et l'équation 2(b) lorsque l'effluent COD reste relativement constant d'un jour à l'autre.

▼B

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Quand on étudie une nouvelle substance, les produits de référence peuvent parfois se révéler utiles; on ne peut cependant pas encore recommander de produits de référence particuliers.

Il est fait mention de données relatives à plusieurs composés qui ont fait l'objet d'essais d'intercomparaison (voir appendice 1), notamment pour pouvoir procéder à l'étalonnage périodique de la méthode et pour permettre de comparer des résultats obtenus par une autre méthode.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Placer des boues activées provenant d'une station d'épuration des eaux usées dans une unité de traitement de boue activée à alimentation semi-continue (SCAS). Ajouter la substance d'essai et des eaux domestiques décantées et aérer le mélange pendant 23 heures. Arrêter ensuite l'aération, mettre la boue à décanter et retirer le liquide surnageant.

Puis, mélanger les boues restées dans l'aérateur à une autre partie aliquote de substance d'essai et d'eaux résiduaires et répéter le cycle.

La biodégradabilité est mesurée en déterminant la teneur en carbone organique dissous du liquide surnageant. Cette valeur est comparée à celle du liquide provenant d'un témoin alimenté uniquement avec des eaux domestiques décantées.

Lorsqu'on effectue une analyse spécifique, la modification de la concentration de la molécule mère en fonction de la biodégradabilité peut être mesurée (biodégradation primaire).

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

La reproductibilité de cette méthode basée sur l'élimination de COD n'a pas encore été établie (en ce qui concerne la biodégradation primaire, on obtient des données très précises pour les substances qui sont fortement dégradées).

La sensibilité de la méthode est en grande partie conditionnée par la variabilité du témoin et, dans une moindre mesure, par la précision de la détermination de COD et par la concentration de la substance d'essai dans le liquide au début de chaque cycle.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.6.1. *Préparations*

Réunir un nombre suffisant d'unités d'aération (l'unité d'essai SCAS de 1,5 litre peut également être utilisée) et de tuyaux d'aération (figure 1) pour chaque substance d'essai et de référence. L'air comprimé fourni aux unités d'essai, nettoyées au moyen d'un filtre de coton hydrophile, ne doit pas contenir de carbone organique et doit être saturé préalablement à l'eau pour réduire les pertes dues à l'évaporation.

Prélever un échantillon de liqueur mixte, contenant de 1 à 4 grammes de solides en suspension par litre dans une station d'épuration de boues activées traitant plus particulièrement les eaux ménagères. Prévoir environ 150 ml de liqueur mixte par aérateur.

▼B

Préparer la solution mère de la substance d'essai dans de l'eau distillée; la concentration normalement requise est de 400 mg/l de carbone organique, ce qui donne une concentration en carbone de la substance d'essai de 20 mg/l au début de chaque cycle d'aération s'il n'y a pas de biodégradation.

Des concentrations plus élevées peuvent être utilisées si la toxicité vis-à-vis des micro-organismes le permet.

On mesure la teneur en carbone organique de la solution mère.

1.6.2. *Mode opératoire*

L'essai doit être effectué à une température comprise entre 20 et 25 °C.

Utiliser une concentration élevée de micro-organismes aérobies (de 1 à 4 g/l de matières en suspension) et respecter une période de rétention effective de 36 heures. Largement oxyder les substances carbonées dans l'effluent d'alimentation, normalement pendant une période de 8 heures suivant le début de chaque cycle d'aération. Laisser ensuite respirer la boue en façon endogène pendant le reste de la période d'aération. Le seul substrat disponible est la substance d'essai, à moins qu'elle n'ait été également métabolisée. Ces conditions, combinées à une réinoculation journalière de l'essai lorsque des eaux domestiques sont utilisées comme milieu, sont extrêmement favorables à l'acclimatation et à une biodégradation rapide.

1.6.3. *Réalisation de l'essai*

Prélever un échantillon de liqueur mixte dans une station d'épuration de boues activées traitant plus particulièrement les eaux domestiques ou dans une unité de laboratoire et le maintenir en aérobiose jusqu'à son utilisation en laboratoire. Chaque aérateur ainsi que l'unité de référence sont remplis avec 150 ml (en cas d'utilisation de l'unité d'essai SCAS originelle, il faut multiplier les volumes donnés par 10) de liqueur mixte et l'aération commence. Après 23 heures, l'aération est arrêtée et on laisse reposer les boues pendant 45 minutes. Ouvrir un à un les robinets de chaque récipient et retirer 100 ml du liquide surnageant. Prélever un échantillon des eaux domestiques décantées immédiatement avant l'utilisation et ajouter 100 ml aux boues demeurant dans chaque aérateur. L'aération est répétée. À ce stade, ne plus ajouter aucune substance d'essai et alimenter journellement les unités avec des eaux ménagères jusqu'à l'obtention d'un liquide surnageant limpide lors de la précipitation. Cette opération prend normalement deux semaines. À ce moment, le COD dans le liquide surnageant à la fin de chaque cycle d'aération tend vers une valeur constante.

À la fin de cette période, mélanger les boues décantées individuellement et ajouter 50 ml de boues composites à chaque unité.

Ajouter 95 ml d'eaux résiduaires décantées et 5 ml d'eau aux unités de référence et 95 m) d'eaux résiduaires décantées et 5 ml de solution mère de la substance d'essai appropriée (400 mg par litre) aux unités d'essai. Procéder à une nouvelle aération pendant 23 heures. Laisser les boues décanter pendant 45 minutes, retirer le liquide surnageant et l'analyser pour déterminer sa teneur en COD.

Cette procédure de prélèvement et de remplissage décrite ci dessus est répétée tous les jours pendant la période de l'essai.

▼B

Avant la décantation, il peut s'avérer nécessaire de nettoyer les parois des unités afin d'empêcher l'accumulation de solides au-dessus du niveau du liquide. Pour nettoyer chaque unité, un hérisson ou une brosse séparée sont utilisés afin d'empêcher la contamination croisée.

Théoriquement, il faudrait déterminer journellement le COD dans les liquides surnageants, mais des analyses moins fréquentes sont autorisées. Avant d'être analysées, les liqueurs doivent être filtrées sur une membrane de 0,45 μm ou centrifugées. Les membranes filtrantes conviennent s'il a été prouvé qu'elles ne libèrent pas de carbone et qu'elles n'absorbent pas la substance d'essai au cours de la filtration. La température de l'échantillon ne doit pas dépasser 40 °C lorsqu'il se trouve dans la centrifugeuse.

La durée de l'essai pour les composés peu ou non biodégradables est indéterminée, mais l'expérience démontre qu'il faut compter au moins 12 semaines et qu'il ne faut pas dépasser 26 semaines.

2. **DONNÉES ET ÉVALUATION**

La courbe de la teneur en COD des liquides surnageants des unités d'essai et des unités de référence est établie en fonction du temps.

Lorsque la biodégradation est terminée, le niveau constaté dans la substance d'essai est voisin de celui du témoin. Lorsque la différence entre ces deux niveaux ne varie plus sur trois mesures consécutives, il suffit alors d'obtenir un nombre de mesures complémentaires suffisantes pour permettre l'analyse statistique des données et de calculer le pourcentage de biodégradation de la substance d'essai (D_{da} ou D_{ssd}: voir 1.2).

3. **PRÉSENTATION DES RÉSULTATS**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible:

— toutes les informations relatives à la nature des eaux résiduaires, au type d'unité utilisé et aux résultats expérimentaux concernant la substance d'essai, a la substance de référence s'il y a lieu et au témoin,

— la température,

— la courbe de disparition avec description, mode de calcul (voir 1.2),

— la date et l'endroit du prélèvement des échantillons de boues activées et d'eaux résiduaires, le degré d'acclimatation, de concentration etc.,

— les raisons scientifiques de toute modification du mode opératoire,

— la signature et la date.

▼B

3.2. INTERPRETATION DES RESULTATS

Étant donné que, en l'occurrence, la substance d'essai n'est pas facilement biodégradable, toute disparition de COD due uniquement à la biodégradation devrait se faire graduellement sur une période de quelques jours ou de quelques semaines, sauf dans les cas où l'acclimatation est soudaine, ce qui se traduit par une brusque disparition après quelques semaines.

Toutefois, l'adsorption physico-chimique peut parfois jouer un rôle important; cela se manifeste par la disparition partielle ou complète du COD ajouté au départ. Ce qui se passe ultérieurement dépend de facteurs tels que les degrés d'adsorption et de concentration des solides en suspension dans l'effluent écarté. Généralement, la différence de concentration en COD dans les liquides surnageants d'essai et de référence augmente graduellement à partir d'une valeur initiale peu élevée et se maintient au niveau de la nouvelle valeur pour la durée restante de l'expérience, à moins qu'une acclimatation n'intervienne.

Pour distinguer la biodégradation (ou la biodégradation partielle) de l'adsorption, il faut procéder à d'autres essais. Il existe plusieurs méthodes mais la plus probante consiste à utiliser les liquides surnageants ou les boues comme inoculum dans un test du dossier de base (de préférence un test respirométrique).

Les substances d'essai faisant disparaître de grandes quantités de COD sans adsorption doivent être considérées comme potentiellement biodégradables. Une disparition partielle, qui n'est pas due à l'adsorption, indique que le produit est susceptible de se dégrader partiellement.

Des disparitions de COD peu importantes ou nulles peuvent être dues à l'inhibition de micro-organismes par des substances d'essai, ce qui peut également se traduire par lyses et perte de boues; dans ce cas, les liquides surnageants sont troubles. Le test doit alors être répété en utilisant une concentration moins élevée de substances d'essai.

L'utilisation d'une analyse spécifique ou d'une substance d'essai marquée au ^{14}C peut permettre une plus grande sensibilité. Dans le cas d'un composé d'essai marqué au ^{14}C, la récupération de $^{14}C0_2$ confirmera la biodégradation.

Lorsque les résultats sont également exprimés en termes de biodégradation primaire, il convient de donner, dans la mesure du possible, des explications sur les modifications intervenues dans les structures chimiques aboutissant au défaut de réponse de la substance d'essai mère.

La validation de l'analyse doit être indiquée avec! e résultat obtenu dans le milieu de l'essai témoin.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) OCDE, Paris, Lignes directrices 302 A, décision du Conseil C(81) 30 final.

▼B

Appendice 1

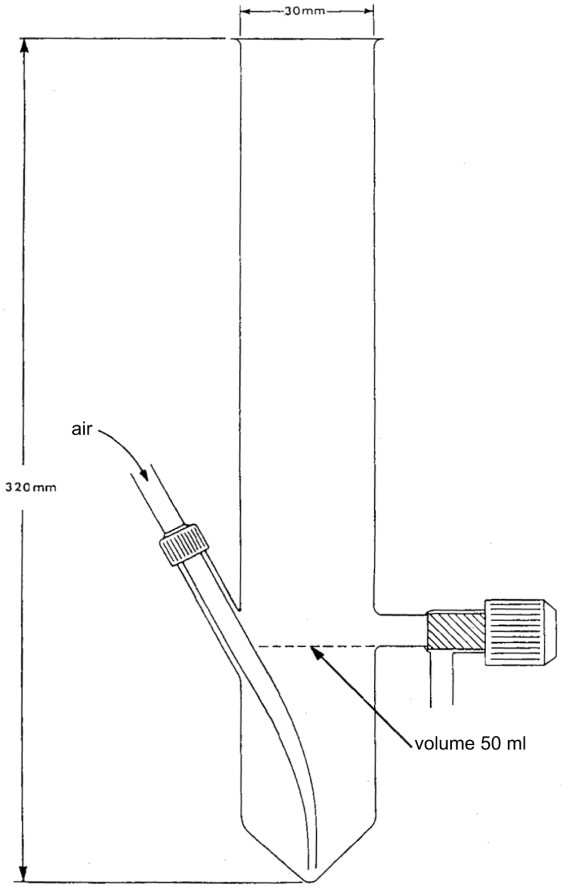
Test S.C.A.S.: exemple de résultats

Substance	C_T (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	Pourcentage biodégradation D_{da}	Durée de l'essai (jours)
4-acétyl aminobenzène sulphonate	17,2	2,0	85	40
Tetra propylène benzène sulphonate	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrophénol	16,9	0,8	95,3	40
Diéthylène glycol	16,5	0,2	98,8	40
Aniline	16,9	1,7	95,9	40
Cyclopentane tétra carboxylate	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Appendice 2

Exemple d'appareil d'essai



▼M7

C.13. BIOACCUMULATION CHEZ LE POISSON: EXPOSITION VIA LE MILIEU AQUATIQUE ET VIA LA VOIE ALIMENTAIRE

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 305 (2012) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Cette révision de la méthode d'essai poursuit deux objectifs. Tout d'abord, il s'agit d'intégrer à la méthode un essai de bioaccumulation via la nourriture ([1]), à même de déterminer le potentiel de bioaccumulation des substances très faiblement solubles dans l'eau. En deuxième lieu, on souhaite élaborer une méthode d'essai qui, dans un souci du bien-être animal, utilise le cas échéant un nombre plus réduit de poissons, et qui soit d'un meilleur rapport rendement-coût.

Depuis l'adoption de la méthode d'essai C.13 (1), de nombreuses substances ont été testées, et les laboratoires comme les autorités réglementaires ont accumulé une expérience considérable. Il en ressort la conviction que l'essai peut être simplifié si des critères spécifiques sont remplis (voir paragraphe 88), et qu'une approche à plusieurs niveaux est possible. L'expérience a aussi montré que les facteurs biologiques comme le développement et la teneur en lipides du poisson ont une forte incidence sur les résultats et doivent probablement être pris en compte. De plus, on admet aujourd'hui que tester des substances très faiblement solubles dans l'eau n'est peut-être pas faisable techniquement. En outre, pour les substances très peu hydrosolubles, l'exposition par l'eau peut présenter moins d'intérêt que l'exposition par la nourriture. D'où le développement d'une méthode d'essai dans laquelle le poisson est exposé via son régime alimentaire (voir paragraphes 7 à 14, puis 97 et suivants). La validation (essai circulaire) de l'essai avec exposition par voie alimentaire a été effectuée en 2010 (51).

Les principaux changements apportés à la méthode d'essai sont les suivants:

— On peut désormais considérer comme suffisant de tester une seule concentration d'essai quand il est probable que le facteur de bioconcentration (FBC) est indépendant de la concentration d'essai.

— Il est possible, si l'on respecte des critères spécifiques, de concevoir un essai d'exposition réduite en milieu aquatique, avec un nombre restreint de temps d'échantillonnage.

— La teneur en lipides du poisson est mesurée pour pouvoir exprimer le FBC sur la base d'une teneur en lipides de 5 %.

— L'accent est mis, outre l'estimation du FBC à l'état stationnaire, sur celle du FBC cinétique (quand elle est possible).

— Pour certains groupes de substances, un essai avec exposition par voie alimentaire sera proposé, quand il paraît plus adapté qu'un essai par exposition via le milieu aquatique.

— Le poisson est pesé, pour pouvoir corriger le FBC_k de l'effet de dilution par la croissance.

Avant de procéder à un essai de bioaccumulation quel qu'il soit, il convient d'avoir sur la substance d'essai les informations suivantes:

(a) Sensibilité de la technique d'analyse utilisée pour mesurer les concentrations présentes dans les tissus et le milieu aquatique ou la nourriture tant de la substance d'essai que de ses possibles métabolites (voir paragraphe 65);

(b) Solubilité dans l'eau [méthode d'essai A.6;]; celle-ci est déterminée selon une méthode adaptée à la plage d'hydrosolubilité (estimée) de manière à obtenir une valeur fiable. Pour les substances hydrophobes, on emploiera généralement la méthode d'élution sur colonne;

([1]) Voir définitions et unités à l'appendice 1.

▼M7

(c) Coefficient de partage n-octanol/eau, K_{oe} [1] [méthodes d'essai A.8 (4), A.24 (5), A.23 (6)]; ou autres informations adaptées sur le comportement en matière de partage (par exemple la sorption sur les lipides, le K_{CO}); ce coefficient est déterminé selon une méthode adaptée à la plage de K_{oe} (estimée) de manière à obtenir une valeur fiable. Pour les substances hydrophobes, on emploiera généralement la méthode du brassage lent [méthode d'essai A.23 (6)];

(d) Stabilité de la substance dans l'eau (hydrolyse [méthode d'essai C.7 (7)]);

(e) Stabilité de la substance dans la nourriture (en particulier si l'essai avec exposition par voie alimentaire est retenu);

(f) Informations sur la phototransformation pertinentes pour les conditions d'irradiation de l'essai (8);

(g) Tension superficielle (pour les substances dont le log K_{oe} ne peut être déterminé) [méthode d'essai A.5 (9)];

(h) Pression de vapeur [méthode d'essai A.4 (10)];

(i) Toute information sur la dégradation biotique ou abiotique dans l'eau, notamment: biodégradabilité facile (exemple non restrictif) [méthodes d'essai C.4 Parties II à VII (11) et C.29 (12)], s'il y a lieu;

(j) Information sur les métabolites: structure, log K_{oe}, formation et dégradabilité, lorsqu'il y a lieu;

(k) Constante acide de dissociation (pK_a) pour les substances susceptibles de s'ioniser. Si besoin est, le pH de l'eau d'essai est ajusté pour s'assurer que la substance se trouve sous sa forme ionisée, si cela est compatible avec l'espèce de poisson choisie.

Indépendamment de la méthode d'exposition ou du dispositif d'échantillonnage retenus, cette méthode d'essai décrit une procédure permettant de caractériser le potentiel de bioaccumulation de substances chez le poisson. Bien qu'il faille accorder une nette préférence aux régimes d'essai en dynamique, les régimes semi-statiques sont acceptables à condition de respecter les critères de validité (voir paragraphes 24 et 113). Dans la méthode avec exposition par voie alimentaire, le régime dynamique n'est pas nécessaire pour maintenir dans le milieu aquatique les concentrations de la substance testée, mais il aidera à maintenir les concentrations adéquates d'oxygène dissous, à assurer la propreté de l'eau et à supprimer l'influence notamment des produits d'excrétion.

Quelle que soit la méthode retenue, cette méthode d'essai offre suffisamment de détails pour que l'on puisse réaliser l'essai, tout en offrant une marge de liberté suffisante pour adapter le schéma expérimental aux conditions particulières des laboratoires et à la variation des caractéristiques des substances d'essai. L'essai par exposition via le milieu aquatique est le plus adapté pour les produits chimiques organiques stables avec des valeurs de log K_{OE} situées entre 1,5 et 6,0 (13), mais peut aussi s'appliquer aux substances très hydrophobes (dont le log K_{OE} est supérieur à 6,0), si l'on peut démontrer l'existence d'une concentration stable et pleinement dissoute de la substance d'essai dans l'eau. Si on ne peut démontrer une telle concentration, l'étude par exposition via le milieu aquatique n'est pas adaptée, aussi faut-il recourir à la méthode par la nourriture (encore que l'interprétation et l'utilisation des résultats de cet essai par voie alimentaire puissent dépendre du cadre réglementaire). Des pré-estimations du facteur de bioconcentration (FBC, parfois noté K_B) pour les produits chimiques organiques dont les valeurs de log K_{OE} sont supérieures à environ 9,0 peuvent être obtenues à l'aide de l'équation de Bintein et al. (14). La pré-estimation du facteur de bioconcentration pour des substances très hydrophobes de ce type peut être supérieure au facteur de bioconcentration à l'état stationnaire (FBC_{ES}) attendu pour des

[1] Parfois noté P_{OE}, il est déterminé par agitation en flacon dans la méthode d'essai A.8 (4), par la méthode HPLC dans la méthode d'essai A.24 (5) et par brassage lent dans la méthode d'essai A.23 (6). La technique par colonne est parfois utilisée pour déterminer le log K_{OE}. Un petit nombre d'études disponibles y recourent, essentiellement pour les biphényles chlorés et les dibenzodioxines (par exemple Li et Doucette, 1993) (3). Pour les substances susceptibles de s'ioniser, le K_{OE} se réfère à la forme non ionisée.

▼M7

expériences en laboratoire, surtout si on utilise pour cette pré-estimation un modèle linéaire simple. Parmi les paramètres caractérisant le potentiel de bioaccumulation figurent la constante cinétique d'absorption (k_1), les constantes de perte dont la constante d'élimination (k_2), le facteur de bioconcentration à l'état stationnaire (FBC_{ES}), le facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k) et le facteur de bioamplification alimentaire (FBA) ([1]).

Le marquage radioactif des substances d'essai peut faciliter l'analyse des échantillons d'eau, de nourriture et de poisson, et être utilisé pour décider s'il y a lieu ou non d'identifier et de quantifier les métabolites. Si la totalité des résidus radioactifs est mesurée seule (par exemple par solubilisation des tissus ou par combustion), le FBC ou le FBA est déterminé à partir de la totalité de la substance parente, des métabolites retenus ainsi que du carbone assimilé. Le FBC ou le FBA déduit de la totalité des résidus radioactifs ne peut donc être directement comparable au FBC ou au FBA obtenu par une analyse spécifique de la substance parente seule. Des procédures de séparation, telles que la CCM, la CLHP ou la CG ([2]) peuvent être utilisées avant les études comportant un marquage radioactif pour déterminer le FBC ou le FBA correspondant à la substance parente. Quand on utilise des procédures de séparation, il convient d'identifier et de quantifier la substance parente et les métabolites pertinents ([3]) (voir paragraphe 65) si le FBC ou le FBA est déduit de la concentration de la substance parente dans le poisson plutôt que de la totalité des résidus radioactifs. Il est également possible de combiner une étude du métabolisme dans le poisson ou une étude de distribution in vivo et une étude de bioaccumulation, grâce à l'analyse et à l'identification des résidus présents dans les tissus. La possibilité de métabolisme peut être prévue par des outils adaptés (par exemple la boîte à outils QSAR de l'OCDE (15) et les programmes QSAR déposés).

Le choix entre un essai par exposition via le milieu aquatique et un essai par voie alimentaire, et celui du dispositif d'essai, s'appuient sur les facteurs évoqués au paragraphe 3, ainsi que sur la réglementation en vigueur. Par exemple, pour des substances à log K_{OE} élevé, mais présentant une bonne solubilité dans l'eau compte tenu de la sensibilité des techniques d'analyse disponibles, un essai par exposition via le milieu aquatique est considéré en premier lieu. Il se peut cependant que l'information sur l'hydrosolubilité ne soit pas définitive pour ce type de produits chimiques hydrophobes, aussi convient-il, avant de décider de la méthode à utiliser (16), d'étudier la possibilité de préparer des concentrations dissoutes dans le milieu aquatique stables et mesurables (les émulsions stables n'étant pas permises) utilisables pour une étude par exposition via le milieu aquatique. Il n'est pas possible de donner des instructions exactes sur la méthode à employer en fonction de critères d'exclusion d'hydrosolubilité et de coefficient de partage octanol-eau, car d'autres facteurs (techniques d'analyse, dégradation, adsorption, etc.) peuvent avoir une influence marquée sur la validité de la méthode, pour les raisons indiquées plus haut. Néanmoins, à partir d'un log K_{OE} supérieur à 5 et d'une solubilité dans l'eau inférieure à ~0,01 — 0,1 mg/l les essais par exposition via le milieu aquatique deviennent de plus en plus difficiles.

D'autres facteurs susceptibles d'influencer le choix de l'essai sont examinés, notamment le potentiel de la substance à l'adsorption vers les récipients d'essai et les appareils, sa stabilité dans la solution aqueuse par rapport à sa stabilité dans la nourriture pour poisson (17) (18), etc.

D'autres études en milieu aquatique peuvent contenir des renseignements sur ces aspects pratiques. De plus amples informations sur l'évaluation des aspects liés à la performance des études de bioaccumulation sont disponibles dans la littérature [par exemple (19)].

S'agissant des substances pour lesquelles la solubilité ou le maintien de la concentration aqueuse et l'analyse de cette concentration ne représentent pas

([1]) Voir définitions et unités à l'appendice 1.

([2]) CCM: chromatographie en couche mince; CLHP: chromatographie en phase liquide à haute performance; CG: chromatographie en phase gazeuse.

([3]) Dans certains cadres réglementaires, l'analyse des métabolites peut être obligatoire dans certaines conditions (voir paragraphe 65).

▼M7

une contrainte pour la réalisation d'un essai par exposition via le milieu aquatique, cette méthode sera préférée pour déterminer le potentiel de bioconcentration. Dans tous les cas, on devra vérifier que la ou les concentrations de l'exposition via le milieu aquatique à appliquer s'inscrivent dans les limites d'hydrosolubilité dans les milieux d'essai. Différentes méthodes peuvent servir à maintenir des concentrations stables de la substance d'essai dissoute. On peut notamment recourir à des solutions mères ou à des systèmes de dosage passif (par exemple à la méthode d'élution sur colonne), pourvu qu'on puisse démontrer que des concentrations stables sont maintenues et que les milieux d'essai respectent les préconisations du paragraphe 27.

Pour les substances très hydrophobes (log K_{OE} supérieur à 5 et solubilité inférieure à ~ 0,01-0,1 mg/l), les essais par exposition via le milieu aquatique peuvent s'avérer ardus. La difficulté peut venir de ce qu'on ne parvient pas à maintenir la concentration aqueuse à un niveau considéré comme suffisamment constant (par exemple du fait de la sorption vers le verre des récipients ou de l'absorption rapide par le poisson) ou de ce que les concentrations aqueuses à appliquer sont si faibles qu'elles sont du même ordre de grandeur que la limite analytique de quantification ou inférieures à elle ([1]). Pour ces substances très hydrophobes, il est recommandé de pratiquer l'essai par voie alimentaire, si celui-ci respecte la réglementation en vigueur et les obligations d'évaluation des risques.

Pour les tensioactifs, il convient d'examiner la faisabilité de l'essai de bioconcentration en milieu aquatique, compte tenu des propriétés de la substance, mais l'étude par voie alimentaire est probablement plus adaptée. Les tensioactifs sont des agents de surface, qui diminuent la tension interfaciale entre deux liquides. Amphiphiles (c'est-à-dire présentant une partie hydrophile et une partie hydrophobe), ils s'accumulent aux interfaces, par exemple eau-air, eau-nourriture et sur les parois en verre, ce qui empêche de déterminer leur concentration aqueuse.

L'essai par voie alimentaire peut contourner certaines difficultés d'exposition pour les mélanges complexes dont les composants présentent des limites d'hydrosolubilité différentes, dans la mesure où il est plus probable d'obtenir une exposition comparable de tous les composants du mélange par voie alimentaire que par exposition en milieu aquatique [voir (20)].

Notons que la méthode par voie alimentaire permet d'obtenir un facteur de bioamplification alimentaire (FBA) et non un facteur de bioconcentration (FBC) ([2]). Il existe des méthodes pour estimer un facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k) à partir des données obtenues dans l'étude par voie alimentaire (voir appendice 8), mais elles sont à utiliser avec précaution. En général, ces méthodes supposent une cinétique du premier ordre, et ne sont applicables qu'à certains groupes de composés. Il est peu probable qu'elles puissent s'appliquer aux tensioactifs (voir paragraphe 12).

L'essai réduit avec exposition via le milieu aquatique comportant moins de temps d'échantillonnage afin de réduire le nombre d'animaux et/ou les ressources (voir paragraphes 83 et suivants) ne devra être choisi que pour les substances pour lesquelles on a des raisons de penser que l'absorption et l'élimination obéiront approximativement à la cinétique du premier ordre (c'est-à-dire en général pour les substances organiques non ionisées, voir paragraphe 88).

C.13 — I: **Essai de bioconcentration chez le poisson par exposition via le milieu aquatique**

PRINCIPE DE L'ESSAI

L'essai se déroule en deux phases: l'exposition (absorption) et la post-exposition (élimination). Pendant la phase d'absorption, un groupe de poissons d'une même espèce est exposé à la substance d'essai à une ou plusieurs concentrations, en fonction des propriétés de la substance (voir paragraphe 49). Ces poissons sont

([1]) En général, les concentrations mesurées dans l'eau durant la phase d'absorption sont supérieures d'au moins une puissance dix à la limite de quantification, de sorte que plus d'une demi-vie de la charge corporelle puisse être mesurée lors de la phase d'élimination de l'étude.

([2]) Voir définitions et unités à l'appendice 1.

▼M7

ensuite transférés vers un milieu dépourvu de la substance d'essai, pour la phase d'élimination. La phase d'élimination est toujours nécessaire, sauf si l'absorption de la substance au cours de la phase d'absorption est négligeable. La concentration de la substance d'essai dans ou sur le poisson (ou dans un tissu spécifié de cet animal) est suivie au cours des deux phases de l'essai. Outre le groupe exposé, un groupe témoin de poissons est élevé dans des conditions identiques, sans être exposé à la substance d'essai, afin de comparer les éventuels effets nocifs observés dans l'essai de bioconcentration au comportement d'un groupe témoin analogue et d'obtenir la concentration naturelle de la substance d'essai ([1]).

Dans l'essai par exposition via le milieu aquatique, la phase d'absorption dure généralement 28 jours. Cette durée peut au besoin être prolongée (voir paragraphe 18), ou raccourcie s'il est démontré que l'état stationnaire a été atteint plus tôt (voir définitions et unités à l'appendice 1). Il est possible de prédire la durée de la phase d'absorption et le temps nécessaire à l'instauration de l'état stationnaire à partir des équations données à l'appendice 5. La phase d'élimination, au cours de laquelle les poissons ne sont plus exposés à la substance d'essai, débute ensuite, les poissons étant transférés dans un récipient propre contenant un milieu identique, mais dépourvu de la substance d'essai. Il est préférable, dans la mesure du possible, de calculer le facteur de bioconcentration de deux manières, d'une part le facteur de bioconcentration à l'état stationnaire (FBC_{ES}; voir définition à l'appendice 1), à savoir le rapport de la concentration dans les poissons (C_p) à la concentration dans l'eau (C_e) et, d'autre part, le facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k; voir définitions et unités à l'appendice 1), à savoir le rapport de la constante cinétique d'absorption (k_1) à la constante cinétique d'élimination (k_2) dans l'hypothèse d'une cinétique du premier ordre ([2]).

Si après 28 jours l'état stationnaire n'est pas encore atteint, il convient soit de calculer le FBC par la méthode cinétique (voir paragraphe 38) soit de prolonger la phase d'absorption. Si le temps requis pour atteindre l'état stationnaire est trop long dans la pratique (voir paragraphes 37 et 38 et appendice 5), on préférera la méthode cinétique. Pour les substances très hydrophobes, on envisagera de pratiquer l'essai par voie alimentaire ([3]), si celui-ci respecte la réglementation en vigueur.

La constante cinétique d'absorption, la constante cinétique d'élimination (pertes) — ou les constantes, si des systèmes plus complexes sont en jeu –, le facteur de bioconcentration (à l'état stationnaire et/ou cinétique) et, si possible, l'intervalle de confiance de chacun de ces paramètres, sont calculés à partir du modèle qui décrit le mieux les concentrations de la substance d'essai mesurées dans les poissons et dans l'eau (voir appendice 5).

La prise de poids des poissons durant l'essai provoquera chez eux une baisse de la concentration de la substance d'essai (c'est ce qu'on appelle la dilution par la croissance). Le FBC cinétique sera donc sous-estimé s'il n'est pas corrigé en conséquence (voir paragraphes 72 et 73).

Le FBC est déduit à partir de la concentration totale dans le poisson (autrement dit en fonction du poids frais total du poisson). On pourra toutefois utiliser des tissus ou des organes déterminés (par exemple les muscles, le foie) pour des raisons particulières, si le poisson est suffisamment grand ou s'il peut être divisé en fractions comestibles (filets) et non comestibles (viscères). Il existe une nette relation entre le potentiel de bioconcentration et l'hydrophobicité pour beaucoup de substances organiques, qui implique une autre relation entre la teneur en lipides du poisson d'essai et la valeur observée de la bioconcentration de ces

([1]) Pour la plupart des substances d'essai, aucune concentration ne doit, dans l'idéal, être détectée dans l'eau témoin. Des concentrations ne doivent se retrouver que pour des matériaux d'origine naturelle (par exemple certains métaux) et des substances omniprésentes dans l'environnement.

([2]) Si, de toute évidence, le système n'obéit pas à une cinétique du premier ordre, il convient de recourir à des modèles plus complexes (voir la bibliographie de l'appendice 5 et demander conseil à un biostatisticien).

([3]) L'absorption peut être limitée par des concentrations d'exposition basses dues à la faible hydrosolubilité de la substance dans l'essai de bioconcentration; l'essai par voie alimentaire permettra, lui, d'atteindre des concentrations d'exposition beaucoup plus fortes.

▼M7

substances. Dès lors, afin de réduire cette source de variabilité dans les résultats des essais portant sur des substances très lipophiles (c'est-à-dire dont le log K_{OE} est inférieur à 3), il convient d'exprimer la bioconcentration de façon normalisée rapportée à un poisson présentant une teneur en lipides de 5 % (de son poids corporel total), outre la bioconcentration obtenue directement de l'essai. Cela est nécessaire pour pouvoir comparer les résultats obtenus pour différentes substances et/ou espèces d'essai. Une teneur en lipides de 5 % est généralement utilisée, car c'est la teneur moyenne en lipides des poissons le plus souvent utilisés dans le cadre de cette méthode d'essai (21)

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

En dehors des propriétés de la substance d'essai énumérées dans l'introduction (paragraphe 3), il y a lieu de connaître sa toxicité pour l'espèce de poisson utilisée dans l'essai, de préférence la CL_{50} asymptotique (indépendante du temps) et/ou sa toxicité estimée lors d'essais à long terme sur des poissons [voir notamment les méthodes d'essai C.47 (22), C.15 (23), C.14(24)].

Il convient de disposer d'une méthode d'analyse appropriée, dont on connaît la fiabilité, la précision et la sensibilité, pour quantifier la substance dans les solutions d'essai et dans le matériel biologique, ainsi que d'instructions précises pour la préparation et le stockage des échantillons. Il convient que la limite analytique de quantification de la substance d'essai dans l'eau et dans les tissus des poissons soit aussi connue. Lorsqu'on utilise une substance marquée à la radioactivité, il convient qu'elle présente une pureté très élevée (de préférence supérieure à 98 %) et que le pourcentage de radioactivité des impuretés soit connu.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

La validité de l'essai est subordonnée à la réalisation des conditions suivantes:

la variation de la température est inférieure à ± 2°C, car des écarts importants peuvent influencer les paramètres biologiques pertinents pour l'absorption et l'élimination, mais aussi stresser les poissons;

la concentration de l'oxygène dissous reste supérieure ou égale à 60 % de saturation;

la concentration de la substance d'essai dans les chambres est maintenue dans un intervalle de + 20 % autour de la moyenne des valeurs mesurées pendant la phase d'absorption;

la concentration de la substance d'essai est inférieure à sa limite de solubilité dans l'eau, en tenant compte de l'effet éventuel de l'eau d'essai sur la solubilité réelle ([1]);

la mortalité, les maladies ou d'autres effets nocifs chez les poissons traités et témoins sont inférieurs à 10 % à la fin de l'essai; lorsque l'essai dure plusieurs semaines ou mois, la mortalité ou d'autres effets nocifs dans les deux groupes de poissons sont inférieurs à 5 % par mois et ne dépasseront pas 30 % en tout. Des différences significatives de croissance moyenne entre les échantillons du groupe d'essai et du groupe témoin pourraient indiquer un effet toxique de la substance d'essai.

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Il serait utile de disposer de substances de référence à faible métabolisme et potentiel de bioconcentration connu pour vérifier le mode opératoire, le cas échéant (par exemple quand un laboratoire n'a encore jamais réalisé l'essai ou quand les conditions expérimentales ont été modifiées).

([1]) Pour les substances multi-composants comme les UVCB (substances de composition inconnue ou variable) et les mélanges, l'hydrosolubilité de chaque composant pertinent est examinée pour déterminer les concentrations d'exposition appropriées.

▼M7

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

Il convient qu'aucune partie du montage ne comporte de matériaux susceptibles d'être dissous, lessivés ou sorbés et de nuire aux poissons. Des récipients classiques, rectangulaires ou cylindriques, composés d'un matériau chimiquement inerte et dotés d'une capacité adaptée au taux de charge (voir paragraphe 43), peuvent être utilisés. Il convient de minimiser l'emploi des tubes en plastique souple. On choisira des tubes en polytétrafluoroéthylène, en acier inoxydable ou en verre. L'expérience a montré qu'en présence de substances d'essai à coefficient d'adsorption élevé, telles que les pyréthrines synthétiques, il sera peut-être nécessaire d'utiliser du verre silanisé. Dans ces circonstances, l'appareillage devra être jeté après usage. Il est préférable d'exposer les systèmes d'essai aux concentrations voulues de la substance d'essai aussi longtemps que nécessaire pour démontrer le maintien de concentrations d'exposition stables avant l'introduction des organismes d'essai.

Eau

Pour l'essai, on utilise généralement une eau naturelle obtenue à partir d'une source non contaminée et de qualité constante. Néanmoins, l'eau reconstituée (eau déminéralisée dans laquelle des nutriments spécifiques ont été ajoutés en quantités connues) peut être plus adaptée pour garantir une qualité uniforme dans le temps. La qualité de l'eau de dilution, c'est-à-dire de l'eau mélangée avec la substance d'essai avant d'être introduite dans le récipient d'essai (voir paragraphe 30), doit permettre à l'espèce de poisson choisie de survivre pendant la durée de l'acclimatation et de l'essai, sans présenter d'anomalies sur le plan du comportement ou de l'apparence. Idéalement, il faudrait démontrer que l'espèce testée peut survivre, croître et se reproduire dans l'eau de dilution (par exemple par un élevage en laboratoire ou par un essai de toxicité sur la totalité du cycle de vie). L'eau de dilution est au moins caractérisée par le pH, la dureté, les solides totaux, le carbone organique total (COT ([1])) et de préférence aussi l'ammonium, les nitrites et l'alcalinité, ainsi que la salinité dans le cas des espèces marines. Les paramètres qui commandent le bien-être optimal des poissons ne sont pas entièrement connus, mais l'appendice 2 fournit les concentrations maximales recommandées de plusieurs paramètres pour des espèces d'eau douce et d'eau de mer.

Il convient que la qualité de l'eau de dilution reste constante tout au long de l'essai. Le pH est compris entre 6,0 et 8,5 au début de l'essai, mais sans varier au-delà de ± 0,5 unité de pH au cours d'un essai donné. On analysera des échantillons prélevés à divers intervalles, afin de veiller à ce que l'eau de dilution n'influence les résultats de l'essai (par exemple par complexation de la substance d'essai) ou ne perturbe le comportement des poissons, au moins au début et à la fin de l'essai. Il convient de déterminer les métaux lourds (par exemple Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), les principaux anions et cations (par exemple Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, $C1^{-}$, SO_4^{2-}), les pesticides (par exemple le total des organophosphorés et le total des organochlorés), le carbone organique total et les solides en suspension, par exemple tous les trois mois si on sait que l'eau de dilution présente une qualité relativement constante. S'il a été prouvé que la qualité de l'eau de dilution est demeurée constante pendant au moins un an, les déterminations peuvent être espacées et avoir lieu, par exemple, tous les six mois).

La teneur naturelle de l'eau de dilution en particules et en carbone organique total est aussi basse que possible pour éviter l'adsorption de la substance d'essai sur la matière organique, ce qui réduirait sa biodisponibilité et conduirait à sous-estimer le FBC. La valeur maximale acceptable s'élève à 5 mg/l pour les matières particulaires (matière sèche retenue par un filtre de 0,45 µm) et à 2 mg/l pour le carbone organique total (voir appendice 2). Au besoin, l'eau de dilution est

([1]) Le COT comprend le carbone organique particulaire et le carbone organique dissous. En d'autres termes, COT = COP + COD.

▼M7

filtrée avant utilisation. Il convient que la contribution des excreta des poissons testés et des résidus alimentaires à la teneur en carbone organique de l'eau d'essai soit aussi faible que possible (voir paragraphe 46).

Solutions d'essai

On préparera une solution mère de la substance d'essai à la concentration appropriée. Il vaut mieux préparer la solution mère par simple mélange ou agitation de la substance d'essai dans l'eau de dilution. Une autre option adaptée dans certains cas consiste à utiliser un système de dosage de désorption de la phase solide. Il est généralement déconseillé de recourir à des solvants et à des dispersants (agents solubilisants) [voir (25)]; néanmoins, l'utilisation de ces produits peut être acceptable pour obtenir une solution mère à la concentration appropriée, mais il convient de s'efforcer d'y recourir aussi peu que possible et de ne pas dépasser leur concentration micellaire critique (le cas échéant). Les solvants qui peuvent être utilisés sont l'acétone, l'éthanol, le méthanol, le diméthylformamide et le triéthylène glycol; les dispersants qui ont été utilisés sont le Tween 80, la méthylcellulose à 0,01 % et l'HCO-40. Il convient que la concentration de solvant dans le milieu d'essai final soit la même dans tous les traitements (indépendamment de la concentration de la substance) et n'excède pas les niveaux de toxicité définis pour le solvant dans les conditions d'essai. La concentration maximale est de 100 mg/l (ou 0,1 ml/l). Il est peu probable qu'une concentration de solvant de 100 mg/l modifie beaucoup la concentration maximale de substance d'essai dissoute pouvant être obtenue dans le milieu d'essai (25). Il convient que la contribution du solvant et celle de la substance d'essai à la teneur en carbone organique total de l'eau de l'essai soient connues. Tout au long de l'essai, la concentration du carbone organique total dans les récipients d'essai ne devra pas dépasser la concentration du carbone organique provenant de la substance d'essai et, le cas échéant, du solvant ou du solubilisant ([1]), de plus de 10 mg/l (± 20 %). La teneur en matières organiques peut avoir un effet important sur le volume de substance d'essai dissoute dans les essais dynamiques, en particulier pour les substances très lipophiles. La microextraction en phase solide (voir paragraphe 60) peut fournir des informations importantes sur le ratio entre composés liés et dissous libres, ces derniers étant considérés comme la fraction biodisponible. Il convient que la concentration de la substance d'essai soit inférieure à la limite de solubilité de cette substance dans le milieu d'essai malgré l'utilisation d'un solvant ou d'un solubilisant. Des précautions s'imposent lors de l'utilisation de solvants facilement biodégradables, ceux-ci pouvant poser des problèmes de prolifération bactérienne dans les essais dynamiques. S'il n'est pas possible de préparer une solution mère sans recourir à un agent solubilisant, il convient d'évaluer l'intérêt d'un essai par exposition en milieu aquatique par rapport à un essai par voie alimentaire.

Les essais dynamiques demandent un système capable de fournir et de diluer continuellement une solution mère de la substance d'essai (par exemple une pompe doseuse, un dilueur proportionnel, un système de saturation) ou un système de dosage de désorption de la phase solide, afin d'obtenir la concentration voulue dans les enceintes d'essai. Le volume sera remplacé de préférence cinq fois par jour dans chaque chambre d'essai. Le régime dynamique est préférable, mais lorsqu'il ne sera pas possible de l'instaurer (par exemple lorsque cela porte préjudice aux organismes testés), une technique semi-statique peut être utilisée à condition de respecter les critères de validité (voir paragraphe 24). Les débits des solutions mères et de l'eau de dilution sont vérifiés 48 heures avant l'essai et au moins une fois par jour pendant l'essai. Au cours de cette vérification, il faudra déterminer le débit dans chaque enceinte d'essai et veiller à ce que sa variation n'excède pas 20 % au sein des enceintes et entre les enceintes.

([1]) Bien que ce ne soit généralement pas recommandé, si un solvant ou un agent solubilisant est utilisé, le carbone organique en provenant est ajouté à celui issu de la substance d'essai pour évaluer la concentration en carbone organique dans les récipients d'essai.

▼M7

Sélection des espèces

Les critères importants dans la sélection des espèces sont leur disponibilité immédiate, leur taille adéquate et le fait qu'elles supportent bien les conditions du laboratoire. D'autres critères orientent la sélection des espèces de poissons, comme leur importance récréative, commerciale et écologique ainsi que leur sensibilité comparable, les bons résultats qu'elles ont donnés précédemment, etc. Des espèces recommandées pour les essais sont énumérées à l'appendice 3. D'autres espèces peuvent être utilisées, mais le mode opératoire devra éventuellement être adapté pour que l'essai se déroule dans des conditions appropriées. Dans ce cas, il convient de justifier le choix de l'espèce et d'exposer la méthode expérimentale. En général, l'utilisation de petites espèces réduira le délai d'établissement du régime stationnaire, mais un plus grand nombre de poissons (prélèvements) peut être nécessaire pour analyser correctement la teneur en lipides et la concentration de la substance d'essai dans les poissons. En outre, des différences de fréquence respiratoire et de métabolisme entre les poissons jeunes et les poissons plus âgés peuvent empêcher les comparaisons entre essais et entre espèces. Pratiquer l'essai sur des poissons à un stade précoce de leur vie (juvéniles) en croissance rapide peut compliquer l'interprétation des données.

Conditions de vie des poissons en laboratoire (pertinentes pour les expositions via le milieu aquatique et par voie alimentaire)

Le stock de poissons est acclimaté dans l'eau pendant au moins deux semaines (voir paragraphe 28) à la température de l'essai et être suffisamment nourri pendant toute cette période (voir paragraphe 45). L'eau et le régime alimentaire sont du même type que ceux qu'on utilisera durant l'essai.

Après une période d'adaptation de 48 heures, on enregistre la mortalité et on applique les critères suivants:

— Si la mortalité est supérieure à 10 % de la population en sept jours: on rejette la totalité du lot;

— Si la mortalité est comprise entre 5 et 10 % de la population en sept jours: on acclimate les organismes pendant sept jours supplémentaires (si la mortalité de la deuxième semaine dépasse 5 %, on rejette la totalité du lot);

— Si la mortalité est inférieure à 5 % de la population en sept jours: on accepte le lot.

On s'assurera que les poissons utilisés dans les essais ne présentent pas de maladies ou d'anomalies observables. Tous les poissons malades seront éliminés. Il convient de ne pas traiter les poissons pour une maladie durant les deux semaines qui précèdent l'essai ou pendant l'essai

DEROULEMENT DE L'ESSAI

Essai préliminaire

Il peut être utile de conduire un essai préliminaire pour optimiser les conditions expérimentales de l'essai définitif, par exemple du point de vue de la sélection de la (des) concentration(s) de la substance d'essai. L'essai préliminaire est conçu de façon à obtenir les informations requises. On peut ainsi examiner si un essai réduit peut suffire à obtenir un FBC ou si une étude complète est requise (voir les paragraphes 83 à 95 sur l'essai réduit).

Conditions d'exposition

Durée de la phase d'absorption

La durée de la phase d'absorption peut être prédite expérimentalement (par exemple à partir d'une étude précédente ou d'une étude d'accumulation portant sur une substance de structure voisine) ou d'après certaines relations empiriques qui exploitent la connaissance que l'on a du coefficient de partage n-octanol/eau ou de l'hydrosolubilité de la substance d'essai (à condition que l'absorption soit régie par une cinétique du premier ordre, voir appendice 5).

▼M7

La phase d'absorption dure 28 jours, sauf s'il est démontré que l'état stationnaire a été atteint plus tôt (voir définitions et unités à l'appendice 1). La courbe de la concentration de la substance d'essai dans le poisson (C_p) en fonction du temps atteint un état stationnaire lorsqu'elle devient parallèle à l'axe du temps et que les résultats de trois analyses successives de la C_p, réalisées sur des échantillons prélevés à au moins deux jours d'intervalle, ne s'écartent pas de plus de 20 % l'un de l'autre, et qu'il n'y a pas d'augmentation nette de C_p dans le temps entre la première et la dernière analyse successive. Les échantillons regroupés font l'objet d'au moins quatre analyses successives. Pour les substances d'essai qui sont absorbées lentement, il serait plus approprié de prendre des intervalles de sept jours. Si l'état stationnaire n'a pas été atteint en 28 jours, il convient soit de calculer le FBC par la méthode cinétique seule, qui ne dépend pas de l'établissement du régime stationnaire, soit de prolonger la phase d'absorption, en poursuivant les mesures, jusqu'à ce que l'état stationnaire soit atteint ou jusqu'à 60 jours, suivant ce qui est le plus rapide. En outre, il convient que la concentration de la substance d'essai dans le poisson à la fin de la période d'absorption soit suffisamment élevée pour permettre une estimation fiable de la constante k_2 lors de la phase d'élimination. Si aucune absorption significative n'est constatée après 28 jours, l'essai peut être arrêté.

Durée de la phase d'élimination

Pour les substances régies par une cinétique du premier ordre, une période égale à la moitié de la phase d'absorption suffit généralement à entraîner une diminution appropriée (par exemple 95 %) de la charge corporelle de la substance d'essai (voir appendice 5 pour une explication de l'estimation). Si le temps requis pour obtenir une élimination de 95 % est trop long dans la pratique et qu'il excède, par exemple, le double de la durée normale de la phase d'absorption (c'est-à-dire plus de 56 jours), on peut appliquer une période plus courte (jusqu'à ce que la concentration de la substance d'essai soit inférieure à 10 % de la concentration à l'état stationnaire, par exemple). Néanmoins, une phase d'élimination plus longue peut être nécessaire pour les substances dont l'absorption et l'élimination suivent des lois plus complexes que celles qui sont représentées par le modèle à compartiment unique pour les poissons, qui obéit à une cinétique du premier ordre. Si on observe de tels phénomènes et/ou si on s'attend à les observer, il est recommandé de demander conseil à un biostatisticien et/ou à un pharmacocinéticien pour garantir un bon dispositif d'essai. Lorsque la phase d'élimination est prolongée, le nombre de poissons à prélever peut devenir un obstacle et les différences dans la croissance des poissons peuvent influencer les résultats. La durée de la phase dépendra également de la période durant laquelle la concentration de la substance d'essai dans les poissons reste supérieure à la limite analytique de quantification.

Nombre de poissons testés

Le nombre de poissons par concentration d'essai est choisi de manière à ce que les échantillons comportent au moins quatre poissons à chaque temps d'échantillonnage. Les poissons ne sont regroupés que si l'analyse d'un seul poisson n'est pas praticable. Si on souhaite une plus grande précision dans l'ajustement des courbes (et dans les paramètres dérivés) ou si des études de métabolisme sont requises (par exemple pour faire la distinction entre les métabolites et la substance mère quand on utilise des substances marquées à la radioactivité), il faut un plus grand nombre de poissons par temps d'échantillonnage. La teneur en lipides et la concentration de la substance d'essai sont déterminées sur le même matériel biologique. Si ce n'est pas faisable, des poissons supplémentaires peuvent être nécessaires (voir paragraphes 56 et 57).

Si l'on utilise des poissons adultes (c'est-à-dire sexuellement matures), il convient qu'ils ne soient pas en période de frai pendant l'essai ou qu'ils n'aient pas récemment frayé. Il faut aussi préciser s'il s'agit de mâles ou de femelles, ou des deux. Si les deux sexes sont utilisés, il convient de démontrer qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux sexes du point de vue de la croissance et de la teneur en lipides avant le début de l'exposition, en particulier si on prévoit que le regroupement de mâles et de femelles sera nécessaire pour obtenir des concentrations détectables de la substance et/ou la teneur en lipides.

▼M7

Dans tous les essais, il convient de choisir des poissons de poids voisin de telle sorte que le poids des plus petits ne soit pas inférieur aux deux tiers du poids des plus gros. Il convient qu'ils soient tous de la même année et proviennent de la même source. Le poids et l'âge d'un poisson pouvant avoir une incidence importante sur le FBC (12), il y a lieu de consigner ces détails avec précision. On recommande de peser un sous-échantillon du stock de poissons peu de temps avant l'essai, afin d'estimer le poids moyen (voir paragraphe 61).

Taux de charge

On appliquera des rapports élevés du volume d'eau au poids des poissons afin de minimiser la réduction de la concentration du composé d'essai dans l'eau provoquée par l'introduction des poissons au début de l'essai et d'éviter une diminution de la concentration de l'oxygène dissous. Il est important d'adapter le taux de charge à l'espèce de poisson. Quoi qu'il en soit, on recommande normalement un taux de charge de 0,1-1,0 g de poissons (poids frais) par litre d'eau et par jour. Des taux de charge plus élevés peuvent être pratiqués, s'il a été prouvé que la concentration requise de la substance d'essai peut être maintenue à ± 20 % près et que la concentration de l'oxygène dissous ne tombe pas en dessous de 60 % de la saturation (voir paragraphe 24).

L'habitat naturel du poisson guide le choix du régime de charge. Les espèces benthiques, par exemple, peuvent avoir besoin d'un aquarium doté d'un plus grand fond pour le même volume d'eau que les espèces pélagiques.

Alimentation

Pendant les périodes d'acclimatation et d'essai, les poissons recevront une alimentation appropriée, dont la teneur en lipides et en protéines totales est connue, en quantité suffisante pour être en bonne santé et conserver leur poids (une certaine croissance est permise). Il convient de les nourrir quotidiennement pendant les périodes d'acclimatation et d'essai suivant un dosage qui est fonction de l'espèce utilisée, des conditions expérimentales et de la valeur calorique des aliments (par exemple pour la truite, un dosage approximatif de 1 à 2 % du poids corporel par jour). La ration alimentaire est définie de manière à éviter un développement rapide et une forte augmentation de la teneur en lipides. Pour maintenir une ration stable, le volume de nourriture est recalculé s'il y a lieu, par exemple une fois par semaine. Pour ce calcul, le poids des poissons de chaque chambre d'essai peut être estimé à partir du poids des derniers poissons prélevés dans cette chambre. Il ne faut pas peser les poissons qui restent dans la chambre.

Dans les chambres d'essai, les aliments non consommés et les excréments seront siphonnés chaque jour, peu après l'alimentation (de 30 minutes à une heure après celle-ci). Il convient que les chambres restent aussi propres que possible tout au long de l'essai, pour maintenir la concentration de matières organiques aussi basse que possible (voir paragraphe 29), la présence de carbone organique pouvant limiter la biodisponibilité de la substance d'essai (12).

Comme beaucoup d'aliments sont à base de farine de poissons, il convient de veiller à ce qu'ils n'influencent pas les résultats de l'essai ou n'induisent pas d'effets négatifs, par exemple en contenant des (traces de) pesticides, de métaux lourds et/ou de la substance d'essai elle-même.

Lumière et température

Une photopériode de 12 à 16 heures est recommandée et il convient que la température (± 2 °C) soit adaptée à l'espèce testée (voir appendice 3). Il convient de connaître le type et les caractéristiques de l'illumination. Il convient de faire attention à une éventuelle phototransformation de la substance d'essai dans les conditions d'irradiation appropriée afin d'éviter d'exposer les poissons à des produits de photodégradation. Dans certains cas, il suffit d'utiliser un filtre pour éliminer les radiations ultra-violet inférieures à 290 nm.

▼M7

Concentrations d'essai

Cet essai a tout d'abord été conçu pour les substances organiques non polaires. Pour ce type de produit, l'exposition d'un poisson à une concentration unique devrait être suffisante, puisqu'on n'attend pas d'effet de concentration, bien que le cadre réglementaire en vigueur puisse exiger deux concentrations. Si on teste d'autres types de substances, ou s'il existe d'autres indications de dépendance éventuelle à la concentration, l'essai est réalisé avec deux concentrations ou plus. Si on ne teste qu'une concentration, il convient de justifier le choix de cette concentration (voir paragraphe 79). En outre, il convient que la concentration testée soit aussi basse qu'il est pratiquement et techniquement faisable (autrement dit, elle n'approche pas la limite de solubilité).

Dans certains cas on peut s'attendre à ce que la bioconcentration d'une substance dépende de sa concentration dans l'eau (par exemple pour les métaux, pour lesquels l'absorption par les poissons peut être au moins en partie régulée). Dans des cas de ce type, il peut être nécessaire de tester au moins deux concentrations, et si possible plus (voir paragraphe 49) pertinentes d'un point de vue environnemental. De plus, pour les substances pour lesquelles les concentrations testées doivent, pour des raisons pratiques, se rapprocher de la limite de solubilité, il est recommandé de tester au moins deux concentrations, ce qui peut donner une idée de la fiabilité des concentrations d'exposition. Parmi les concentrations d'essai figurent la concentration réaliste sur le plan environnemental ainsi que celle pertinente pour l'objet spécifique de l'évaluation.

Il convient que la ou les concentrations de la substance d'essai soient inférieures au niveau auquel elles produisent un effet chronique ou à 1 % de la CL_{50} aiguë asymptotique, s'inscrivent dans une fourchette pertinente du point de vue de l'environnement et soient supérieures d'au moins une puissance dix à la limite de quantification dans l'eau par la méthode d'analyse utilisée. La concentration d'essai la plus élevée admise peut être déterminée en divisant la CL_{50} aiguë (96 h) par un rapport aigu/chronique (par exemple des rapports adéquats pour certaines substances chimiques se situent autour de 3, mais quelques-uns sont au-dessus de 100). Si une seconde concentration est utilisée, il convient qu'elle diffère de la première d'un facteur dix. Si ce n'est pas possible en raison du critère de toxicité (qui plafonne la concentration d'essai) et du seuil de détection analytique, il convient d'envisager d'appliquer un facteur inférieur à 10 et d'utiliser une substance d'essai marquée à la radioactivité (de la pureté la plus élevée, de préférence supérieure à 98 %). Il convient de veiller à ce que la concentration de la substance d'essai ne dépasse pas sa solubilité dans le milieu d'essai.

Témoins

Un groupe témoin traité avec de l'eau de dilution ou, le cas échéant, (voir paragraphes 30 et 31), avec le solvant est testé parallèlement aux groupes traités avec la substance d'essai.

Fréquence des mesures de la qualité de l'eau

Pendant l'essai, l'oxygène dissous, le carbone organique total, le pH et la température sont mesurés dans tous les récipients d'essai et témoins. La dureté totale et la salinité (le cas échéant) sont mesurées dans le(s) groupe(s) témoin(s) et dans le récipient. Si au moins deux concentrations sont testées, il convient de mesurer ces paramètres à la concentration la plus élevée. L'oxygène dissous et la salinité (le cas échéant) sont mesurés au moins trois fois pendant la période d'absorption (au début, vers le milieu et à la fin) et au moins une fois par semaine pendant la période d'élimination. Le carbone organique total est mesuré au début de l'essai (24 h et 48 h avant le début de la phase d'absorption) avant l'introduction des poissons et au moins une fois par semaine pendant les phases d'absorption et d'élimination. La température devrait être mesurée et enregistrée quotidiennement, le pH au début et à la fin de chaque période et la dureté une fois au cours de l'essai. La température est de préférence mesurée en continu dans au moins un récipient.

▼M7

Prélèvement et analyse des poissons et de l'eau

Programme de prélèvement des poissons et de l'eau

On prélèvera de l'eau dans les chambres d'essai afin de déterminer la concentration de la substance d'essai avant l'introduction des poissons et pendant les phases d'absorption et d'élimination. L'eau est prélevée en même temps que les poissons et avant leur alimentation. Des prélèvements plus fréquents peuvent être utiles pour garantir la stabilité des concentrations après l'introduction des poissons. Il convient de déterminer les concentrations de la substance d'essai pendant la phase d'absorption pour vérifier si les critères de validité ont été respectés (paragraphe 24). Si l'analyse de l'eau prélevée au début de la phase d'élimination ne détecte pas de substance d'essai, cela peut justifier de ne plus rechercher la présence de cette substance dans l'eau d'essai et l'eau témoin pour le restant de la phase d'élimination.

Les poissons seront prélevés au moins cinq fois pendant la phase d'absorption et au moins quatre fois pendant la phase d'élimination de la substance d'essai. Comme dans certains cas il sera difficile de calculer une estimation raisonnablement précise du FBC avec ce nombre d'échantillons (en particulier lorsque l'absorption et l'élimination n'obéiront pas à une simple cinétique du premier ordre), il peut se justifier de prélever des échantillons plus fréquemment au cours des deux périodes (voir appendice 4).

La teneur en lipides et la concentration de la substance d'essai sont déterminées sur le même matériel biologique au moins au début et à la fin de la phase d'élimination. Si ce n'est pas praticable, au moins trois poissons devront être prélevés pour déterminer leur teneur en lipides à chacun des trois mêmes temps d'échantillonnage. Il faudra ajuster en conséquence le nombre de poissons par récipient au début de l'expérience ([1]). Sinon, si on ne détecte pas un volume important de substance d'essai dans les poissons témoins (c'est-à-dire les poissons du stock), les poissons témoins de l'essai peuvent n'être analysés que pour leur teneur en lipides, et l'analyse de la substance d'essai dans le ou les groupes d'essai (ainsi que la constante cinétique d'absorption, la constante cinétique d'élimination et le FBC associés) peut être corrigée en fonction de la teneur en lipides du groupe témoin au cours de l'essai ([2]).

Les poissons morts ou malades ne sont pas analysés à la recherche d'une concentration de la substance d'essai ou de leur teneur en lipides.

Un exemple de programme de prélèvement acceptable est donné à l'appendice 4. D'autres programmes peuvent être établis facilement d'après d'autres valeurs supposées du K_{OE} qui permettent de calculer le temps d'exposition correspondant à une absorption de 95 % (se reporter à l'appendice 5 pour les calculs).

Pendant la phase d'absorption, les prélèvements se poursuivent jusqu'à ce que l'état stationnaire soit atteint (voir définitions et unités à l'appendice 1) ou que la phase d'absorption s'achève (après 28 ou 60 jours, voir paragraphes 37 et 38). Avant d'entamer la phase d'élimination, il convient de transférer les poissons dans des récipients propres.

Prélèvement et préparation des échantillons

On prélèvera les échantillons d'eau à analyser par exemple en siphonnant à travers un tube inerte à partir d'un point central de l'enceinte d'essai. La centrifugation ou la filtration ne réussissent pas toujours à séparer les fractions biodisponible et non biodisponible de la substance d'essai. Si on recourt à une technique de séparation, il convient de la justifier ou de la valider dans le rapport

([1]) Si la teneur en lipides et la concentration de la substance d'essai ne sont pas mesurées sur le même poisson, les poissons utilisés ont au moins un poids similaire et (si approprié) être du même sexe.

([2]) Cette solution alternative n'est valable que si les poissons de tous les groupes d'essai sont répartis en groupes de taille similaire, prélevés selon la même méthode et nourris de manière identique. Cela garantit que la croissance des poissons est la même dans tous les groupes d'essai, si la concentration testée est inférieure au seuil toxique. Si la croissance est similaire, la teneur en lipides devrait l'être aussi. Une différence de croissance dans le groupe témoin indiquerait un effet de la substance et invaliderait l'essai.

▼M7

d'essai, compte tenu des difficultés de biodisponibilité (25). Les prélèvements de substances très hydrophobes, en particulier (c'est-à-dire dont le log K_{OE} est inférieur à 5) (12) (26), pour lesquels une adsorption vers le filtre ou vers les récipients de centrifugation peut survenir, ne sont pas soumis à ces traitements. En revanche, il convient de s'efforcer de maintenir la plus grande propreté dans les aquariums (voir paragraphe 46) et de suivre la teneur en carbone organique totale pendant les phases d'absorption et d'élimination (voir paragraphe 53). Pour éviter les problèmes potentiels dus à la réduction de la biodisponibilité, on peut réaliser, pour les substances faiblement solubles et très hydrophobes, des prélèvements par techniques de microextraction en phase solide.

Il convient d'euthanasier instantanément les poissons prélevés, suivant la méthode la plus appropriée et la moins cruelle (pour des mesures sur des poissons entiers, il suffit de rincer ceux-ci à l'eau (voir paragraphe 28) et de les sécher en surface). Il convient ensuite de peser les poissons et de mesurer leur longueur totale ([1]). Pour chaque poisson, le poids et la longueur mesurés sont reliés à la concentration de la substance analysée (et s'il y a lieu à la teneur en lipides), par exemple en attribuant un identifiant unique à chaque poisson prélevé.

Il est préférable d'analyser les poissons et l'eau immédiatement après les avoir prélevés pour éviter les dégradations ou d'autres pertes et de calculer des constantes d'absorption et d'élimination approximatives pendant le déroulement de l'essai. En procédant à une analyse immédiate, on évite aussi de retarder la détermination du moment où le plateau (état stationnaire) a été atteint.

À défaut de pouvoir pratiquer une analyse immédiate, on stockera les échantillons selon une méthode appropriée. Avant de commencer l'étude, on se renseignera sur la méthode de stockage adaptée à la substance d'essai, par exemple la congélation, la conservation à 4 °C, l'extraction, etc. La durée de stockage est choisie de façon à ce que la substance chimique ne se dégrade pas pendant le stockage.

Qualité de la méthode d'analyse

Comme toute la procédure est essentiellement subordonnée à la fiabilité, la précision et la sensibilité de la méthode d'analyse appliquée à la substance d'essai, il convient de vérifier expérimentalement que la précision et la reproductibilité de l'analyse chimique ainsi que l'isolement de la substance d'essai à partir de l'eau et du poisson sont satisfaisants pour la méthode en question. Ces vérifications s'effectuent au cours des essais préliminaires. Il convient de s'assurer également que la substance d'essai n'est pas détectable dans l'eau de dilution utilisée. Il faudra, au besoin, corriger les valeurs de la concentration de la substance d'essai dans l'eau et dans les poissons en fonction des valeurs fournies par les témoins pour l'isolement de la substance d'essai et sa concentration naturelle. Les échantillons d'eau et de poisson sont manipulés avec soin tout au long de l'essai de manière à minimiser la contamination et les pertes (provoquées par l'adsorption sur l'instrument de prélèvement, par exemple).

Analyse des échantillons de poissons

Si on utilise du matériel marqué pendant l'essai, il est possible d'analyser la radioactivité totale (c'est-à-dire celle de la substance parente et des métabolites) ou de purifier les échantillons pour analyser la substance parente séparément. Si le FBC doit s'appuyer sur la substance parente, les principaux métabolites sont caractérisés, au minimum à la fin de la phase d'absorption (voir paragraphe 6). Les principaux métabolites sont ceux qui représentent au moins 10 % des résidus totaux présents dans les tissus des poissons, ceux qui en représentent au moins 5 % à deux temps d'échantillonnage consécutifs, ceux en hausse tout au long de la phase d'absorption, enfin, ceux dont on sait qu'ils posent des problèmes toxicologiques. Si le FBC pour l'ensemble du poisson, en termes de résidus radiomarqués totaux, est supérieur ou égal à 500, il peut être conseillé, et même fortement recommandé dans le cas de certaines substances chimiques comme

([1]) Outre le poids, la longueur totale est enregistrée car l'augmentation de cette longueur au cours de l'essai est un bon indicateur de la survenue d'un éventuel effet négatif.

▼M7

les pesticides — d'identifier et de quantifier les principaux métabolites. La quantification de ces métabolites peut être exigée par certaines autorités réglementaires. Si les produits de dégradation représentant 10 % ou plus (> 10 %) des résidus radioactifs totaux dans les poissons sont identifiés et quantifiés, il est alors aussi recommandé d'identifier et de quantifier les produits de dégradation dans l'eau d'essai. Si ce n'est pas praticable, il y a lieu de l'expliquer dans le rapport.

La concentration de la substance d'essai est habituellement déterminée pour chaque poisson pesé individuellement. Si cela est impossible, on peut regrouper les échantillons d'un même prélèvement, mais cette opération limite le traitement statistique applicable aux résultats, aussi y a-t-il lieu d'inclure un nombre suffisant de poissons dans l'essai pour que le regroupement, la procédure et la précision voulus soient possibles. Les références (27) et (28) peuvent servir d'introduction sur les procédures de regroupement adaptées.

Il convient d'exprimer le FBC de façon normalisée rapportée à un poisson présentant une teneur en lipides de 5 % (par rapport à son poids frais), outre le FBC obtenu directement de l'essai (voir paragraphe 21), à moins de pouvoir démontrer que la substance d'essai ne s'accumule pas prioritairement dans les lipides. Il faut, si possible, déterminer la teneur en lipides des poissons à chaque prélèvement, de préférence à partir du même extrait que la substance d'essai, l'extrait devant souvent être débarrassé de ses lipides avant d'être analysé par chromatographie. Néanmoins, l'analyse des substances d'essai nécessite souvent des procédures d'extraction spécifiques, qui peuvent être en contradiction avec les lignes directrices concernant la détermination des lipides. Dans ce cas (jusqu'à ce que des méthodes instrumentales non destructives adaptées soient disponibles), il est recommandé d'employer une stratégie différente pour déterminer la teneur en lipides des poissons (voir paragraphe 56). Les lipides sont déterminés suivant les méthodes appropriées (20). On recommande (30) habituellement la technique d'extraction chloroforme/méthanol (29), mais la méthode de Smedes (31) peut également être utilisée. Elle présente la même efficacité d'extraction, une grande précision, utilise moins de solvants organiques toxiques et facilite la performance. D'autres méthodes dont la précision soutient la comparaison avec les méthodes recommandées peuvent être utilisées, à condition de justifier correctement leur choix. Il est important de donner des détails sur la méthode mise en œuvre.

Mesure du développement des poissons

Au début de l'essai, il convient de peser et de mesurer un à un cinq à dix poissons du stock. Il peut s'agir des mêmes poissons utilisés pour l'analyse lipidique (voir paragraphe 56). Il convient de mesurer le poids et la longueur des poissons issus des groupes d'essai et témoins utilisés pour chaque échantillonnage avant de procéder à leur analyse chimique ou lipidique. Ces mesures peuvent servir à estimer le poids et la longueur des poissons restant dans les récipients d'essai et témoins (voir paragraphe 45).

RAPPORT D'ESSAI ET RÉSULTATS

Traitement des résultats

On tracera la courbe de l'absorption de la substance d'essai en portant sur un diagramme arithmétique sa concentration dans/sur le poisson (ou dans des tissus spécifiés) pendant la phase d'absorption en fonction du temps. Si la courbe atteint un plateau, autrement dit si elle devient approximativement asymptotique par rapport à l'axe du temps, on calcule le FBC à l'état stationnaire (FBC_{ES}) à l'aide de la formule suivante:

$$\frac{C_p \text{à l'état stationnaire}(\text{moyenne})}{C_e \text{à l'état stationnaire}(\text{moyenne})}$$

▼M7

Le développement de C_p peut être influencé par la croissance des poissons (voir paragraphes 72 et 73). La concentration moyenne d'exposition (Ce) est influencée par la variation dans le temps. On peut s'attendre à ce qu'une concentration moyenne pondérée par rapport au temps soit plus pertinente, même si la variation s'inscrit dans les limites de la fourchette de validité (voir paragraphe 24). Une moyenne pondérée par rapport au temps de la concentration dans l'eau peut être calculée en suivant les instructions données à l'appendice 5, section 1

Il y a lieu de déterminer le facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k) en calculant le ratio k_1/k_2, k_1 et k_2 étant les deux constantes cinétiques du premier ordre. Les constantes cinétiques k_1 et k_2 et le FBC_k peuvent être déduits en évaluant simultanément la phase d'absorption et la phase d'élimination. Une autre solution consiste à déterminer k_1 et k_2 l'un après l'autre (voir l'appendice 5 qui décrit et compare ces méthodes). La constante d'élimination (k_2) peut devoir être corrigée de l'effet de dilution par la croissance (voir paragraphes 72 et 73). Si la courbe d'absorption et/ou d'élimination n'obéit manifestement pas à une cinétique du premier ordre, il convient d'employer des modèles plus complexes (voir la bibliographie de l'appendice 5) et de demander conseil à un biostatisticien et/ou à un pharmacocinéticien.

Poids et longueur des poissons

Le poids frais et la longueur totale de chaque poisson, à chaque temps d'échantillonnage, sont présentés séparément pour les groupes d'essai et les groupes témoins pendant les phases d'absorption et d'élimination (y compris les poissons du stock au début de la période d'absorption). Pour chaque poisson, le poids et la longueur sont reliés à la concentration chimique analysée, par exemple en attribuant un identifiant unique à chaque poisson prélevé. Le poids est la mesure du développement à privilégier afin de corriger le FBC cinétique de l'effet de dilution par la croissance. Le paragraphe 73 et l'appendice 5 présentent la méthode utilisée pour cette correction.

Correction de la dilution par la croissance et normalisation des lipides

Le développement des poissons pendant la phase d'élimination peut réduire les concentrations chimiques mesurées chez eux, ce qui augmente la constante cinétique d'élimination globale (k_2) par rapport à ce que provoqueraient les processus d'élimination seuls (par exemple respiration, métabolisme, égestion). Les facteurs de bioconcentration cinétique sont corrigés de la dilution par la croissance. Le FBC_{ES} est aussi influencé par la croissance, mais il n'existe aucune procédure de correction convenue en la matière. Dans les cas de croissance importante, le FBC_k corrigé de la croissance (FBC_{kg}) est aussi calculé car il peut s'avérer plus pertinent. La teneur en lipides des poissons d'essai (fortement associée à la bioaccumulation des substances hydrophobes) peut suffisamment varier dans la pratique pour qu'une normalisation rapportée à une teneur en lipides prédéfinie (5 % du poids frais) soit nécessaire pour obtenir des facteurs de bioconcentration cinétique et à l'état stationnaire qui aient un sens — sauf si l'on peut démontrer que la substance ne s'accumule pas prioritairement dans les lipides (par exemple certaines substances perfluorées peuvent se lier aux protéines). L'appendice 5 présente les équations et donne des exemples de calculs de ce type.

Pour corriger un FBC cinétique de la dilution par la croissance, il convient de corriger la constante cinétique d'élimination de la croissance. Cette constante cinétique d'élimination corrigée (k_{2g}) s'obtient en soustrayant la constante cinétique de croissance (k_g, déduite du poids mesuré) de la constante cinétique d'élimination globale (k_2). Le facteur de bioconcentration cinétique corrigé de la croissance se calcule alors en divisant la constante cinétique d'absorption (k_1) par la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance (k_{2g}) (voir appendice 5). Dans certains cas, cette méthode est inadaptée. Par exemple, pour des substances s'éliminant très lentement testées chez des poissons à croissance rapide, la k_{2g} obtenue peut être très faible, aussi toute erreur commise dans les deux constantes cinétiques servant à la calculer est-elle cruciale, et dans

▼M7

certains cas la k_g estimée peut être supérieure à k_2. Une autre méthode contournant la nécessité d'une correction de la dilution par la croissance consiste à utiliser le poids de substance d'essai par poisson (entier) lors de l'élimination plutôt que le poids de substance par unité de masse du poisson (concentration). Ce calcul est facile à faire, car dans le cadre d'essais respectant cette méthode d'essai, on associe les concentrations tissulaires aux poids individuels des poissons. L'appendice 5 présente la procédure de calcul simple. Il convient de souligner que le recours à cette méthode alternative n'empêche pas qu'il faille consigner la valeur de k_2.

Les facteurs de bioconcentration cinétique et à l'état stationnaire sont aussi être consignés, rapportés à une teneur en lipides par défaut de 5 % (du poids frais du poisson), sauf si l'on peut prouver que la substance d'essai ne s'accumule pas prioritairement dans les lipides. Les données relatives à la concentration dans le poisson, ou le FBC, sont normalisées en fonction du ratio entre ces 5 % et la teneur réelle moyenne en lipides d'un poisson (en pourcentage de son poids frais) (voir appendice 5).

Si l'analyse chimique et l'analyse lipidique ont été menées sur le même poisson, il convient d'utiliser ces données lipidiques individuelles normalisées pour calculer un FBC normalisé par rapport aux lipides. Autre possibilité, si la croissance des poissons est similaire dans les groupes exposés et les groupes témoins, on peut n'utiliser que la teneur en lipides des poissons témoins pour la correction en fonction des lipides (voir paragraphe 56). L'appendice 5 décrit une méthode de calcul du FBC normalisé par rapport aux lipides.

Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés avec prudence lorsque les valeurs mesurées de la concentration des solutions d'essai avoisinent le seuil de détection de la méthode d'analyse.

La croissance moyenne dans le groupe d'essai et celle dans le groupe témoin en principe ne diffèrent pas beaucoup afin d'exclure les effets toxiques. Les constantes cinétiques de croissance ou les courbes de croissance des deux groupes sont comparées au moyen d'une procédure adaptée ([1]).

Des courbes d'absorption et d'élimination clairement définies attestent que les résultats concernant la bioconcentration sont de bonne qualité. S'agissant des constantes cinétiques, il convient que le test du χ^2 constate un bon ajustement du modèle de bioaccumulation [à savoir un faible pourcentage d'erreur dans les mesures (32)] pour que les constantes puissent être considérées comme fiables (voir appendice 5). Si on utilise plus d'une concentration d'essai, il convient que la variation des constantes d'élimination et d'absorption entre les concentrations d'essai soit inférieure à 20 % ([2]). Sinon, la dépendance à la concentration peut être indiquée. L'observation de différences significatives entre les vitesses d'absorption ou d'élimination mesurées aux diverses concentrations d'essai est signalée et donne lieu à des explications possibles. En général, si l'étude a été bien conçue, le seuil de confiance du FBC à 95 % tourne autour de 20 % du FBC obtenu.

Si on teste deux concentrations ou plus, les chiffres obtenus à toutes ces concentrations servent à étudier la cohérence des résultats et à mettre en évidence une

([1]) On peut réaliser un test t sur les constantes cinétiques de croissance, pour tester si le développement entre les groupes témoins et d'essai varie, ou test F en cas d'analyse des écarts. Si besoin, on peut recourir à un test F ou à un essai fondé sur les rapports de probabilité pour faciliter le choix du modèle de croissance approprié [monographie OCDE n° 54 (32)].

([2]) Ces pourcentages supposent la fiabilité des méthodes d'analyse et une demi-vie inférieure à 14 jours. Si les méthodes d'analyse sont moins fiables ou si la demi-vie est (très) supérieure, les chiffres seront plus élevés.

▼M7

éventuelle dépendance à la concentration. Si une seule concentration est testée afin de réduire le nombre d'animaux et/ou les ressources utilisés, il y a lieu de justifier ce choix.

Le FBC calculé est incertain si le FBC_k est nettement supérieur au FBC_{ES}, car cela peut indiquer que l'état stationnaire n'a pas été atteint ou que la dilution par la croissance et les processus de pertes n'ont pas été pris en compte. Dans les cas où le FBC_{ES} est très supérieur au FBC_k, le calcul des constantes cinétiques d'absorption et d'élimination est vérifié. Une procédure de validation de l'ajustement différente peut améliorer l'estimation du FBC_k (voir appendice 5).

Rapport d'essai

Outre les informations sur la substance d'essai énumérées au paragraphe 3, le rapport d'essai comporte les renseignements suivants:

Substance d'essai

État physique et, si nécessaire, propriétés physico-chimiques;

— identité chimique, par exemple nom CAS/UICPA, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés le cas échéant et si c'était faisable en pratique, etc. (y compris la teneur en carbone organique, si cela se justifie).

— pour les substances multicomposants et UVCB (substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexe et matières biologiques) il y a lieu de décrire avec autant de précision que possible l'identité chimique des différents composants, et d'indiquer pour chacun quel pourcentage de la masse totale de la substance il représente. Il convient d'expliquer succinctement pourquoi la méthode d'analyse utilisée permet de mesurer la concentration de la substance, et de décrire toutes les procédures d'analyse en indiquant notamment le degré de précision de la méthode, son seuil de détection et sa limite de quantification.

— en cas de marquage, position précise des atomes marqués et pourcentage de radioactivité lié aux impuretés.

— informations sur la toxicité de la substance d'essai pour le poisson (idéalement l'espèce testée). La toxicité est consignée sous forme de CL50 aiguë (96 h) et de CSENO et CMENO tirées d'une étude chronique (essais réalisés soit aux premiers stades de la vie, soit tout au long du cycle de vie, si disponibles).

— conditions de stockage du produit ou de la substance chimique d'essai et, le cas échéant, stabilité du produit ou de la substance chimique d'essai dans les conditions de stockage antérieures.

Espèce testée:

Nom scientifique, souche, origine, pré-traitement éventuel, acclimatation, âge, sexe (s'il y a lieu), taille (poids et longueur), etc.

Conditions expérimentales:

— Procédé d'essai suivi (par exemple, semi-statique ou dynamique); étude complète ou réduite (avec arguments de justification).

— Type et caractéristiques de l'illumination utilisée et photopériode(s).

— Schéma de l'essai (par exemple, nombre et dimension des enceintes d'essai, débit de remplacement de l'eau, taux de charge, nombre de réplicats, nombre de poissons par réplicat, nombre de concentrations différentes utilisées au cours de l'essai, longueur des phases d'absorption et d'élimination, fréquence de prélèvement des échantillons d'eau et de poissons).

▼M7

— Méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (le solvant, sa concentration et sa contribution à la teneur en carbone organique de l'eau d'essai sont mentionnés, le cas échéant) ou description du système de dosage alternatif.

— Concentrations d'essai nominales, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types dans les cuves d'essai, méthode de calcul de ces paramètres et données et fréquence à laquelle ils sont calculés.

— Source de l'eau de dilution, description du traitement préalable éventuel, résultats de la démonstration éventuelle de la capacité des poissons testés à vivre dans cette eau et caractéristiques de celle-ci: pH, dureté, température, concentration de l'oxygène dissous, teneurs en chlore résiduel (si elles ont été mesurées), carbone organique total, solides en suspension, salinité du milieu d'essai (si justifié) et toute autre mesure effectuée.

— Qualité de l'eau dans les récipients d'essai, pH, dureté, carbone organique total, température et concentration de l'oxygène dissous; notamment méthodes utilisées et fréquence des mesures.

— Informations détaillées sur l'alimentation (par exemple, type d'aliment(s), source, composition — si possible, donner au moins les teneurs en lipides et en protéines), ration alimentaire choisie, quantité donnée et fréquence.

— Informations sur le traitement des échantillons de poissons et d'eau, y compris les détails de la préparation, du stockage, de l'extraction et des procédés d'analyse (et leur précision) pour la substance d'essai et la teneur en lipides.

— Méthodes utilisées pour la randomisation des traitements et l'affectation des poissons aux récipients d'essai.

— Date d'introduction des organismes d'essai dans les solutions d'essai et durée de l'essai.

— Description des essais de détermination de l'ordre de grandeur et des résultats obtenus, s'il y a lieu.

Résultats:

— Résultats de l'étude préliminaire éventuelle.

— Mortalité des poissons témoins et des poissons de chaque chambre d'exposition et comportements anormaux éventuels.

— Informations sur les effets nocifs observés.

— Description complète de tous les procédés d'analyse chimique utilisés, y compris les seuils de détection et de quantification, la variabilité et l'isolement.

— Teneur en lipides des poissons, y compris la méthode appliquée, et si déduit le facteur de normalisation des lipides (L_n, facteur pour exprimer les résultats relatifs à un poisson présentant une teneur en lipides de 5 %).

— Tableau des poids (et longueurs), reliés aux concentrations chimiques (et à la teneur en lipides, s'il y a lieu) dans chaque poisson des groupes témoin et d'essai (par exemple en attribuant un identifiant unique à chaque poisson prélevé) et calculs pour les constante(s) cinétique(s) de croissance obtenues.

▼M7

— Tableau des concentrations de la substance d'essai dans les poissons (C_p, pour chaque poisson) et dans l'eau (C_e) (avec les valeurs moyennes pour les groupes d'essai et témoin, écart-type et fourchette, s'il y a lieu) pour tous les temps de prélèvement (C_p exprimé en mg/k_g de poids frais d'un poisson entier ou de tissus spécifiques, par exemple lipidiques, et C_e en mg/l). Valeurs de Ce des séries témoins (tous les éléments à l'appui sont également mentionnés).

— Courbes (incluant toutes les données mesurées), montrant (s'il y a lieu, les concentrations peuvent être exprimées pour l'animal entier ou des tissus spécifiques et la teneur en lipides être normalisée à 5 % de l'animal ou de tissus spécifiques):

  — le développement (soit le poids du poisson en fonction du temps) ou le poids transformé en logarithme naturel en fonction du temps (y compris la constante cinétique de croissance déduite, k_g);

  — l'absorption et l'élimination de la substance d'essai dans le poisson, (sur un graphique);

  — le délai d'établissement du régime stationnaire (si atteint);

  — la concentration transformée en logarithme naturel en fonction du temps d'absorption (y compris la constante cinétique d'élimination obtenue k_1);

  — la concentration transformée en logarithme naturel (ln concentration) en fonction du temps d'élimination (y compris la constante cinétique d'élimination obtenue k_2); et

  — les deux courbes des phases d'absorption et d'élimination, montrant les données et le modèle ajusté.

— Si aucun point aberrant manifeste n'est observé sur un tracé, on pourra appliquer le test du point aberrant statistiquement valide pour supprimer les points parasites et on justifiera dûment leur omission.

— Facteur de bioconcentration à l'état stationnaire, (FBC_{ES}), si l'état stationnaire est (presque) atteint.

— Facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k) et constantes cinétiques d'absorption et d'élimination obtenues k_1 et k_2, avec les écarts de k_2 (pente et ordonnée à l'origine) dans le cas d'un ajustement séquentiel.

— Intervalle de confiance, écart-type (s'il est connu) et méthodes de traitement informatique/d'analyse des données pour chaque paramètre et chaque concentration de la substance d'essai.

  — Toute information concernant les métabolites de la substance chimique radiomarquée et leur accumulation.

  — Constante(s) cinétique(s) de croissance (y compris intervalle(s) de confiance de 95 %) et la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance(k_{2g}), la demi-vie et le FBC (FBC_{kg}).

  — Toute anomalie concernant l'essai, tout écart à ces modes opératoires et toute autre information pertinente.

  — Un tableau synthétisant les données mesurées et calculées pertinentes, comme ci-après:

▼M7

Constantes cinétiques d'absorption et d'élimination de la substance et facteurs de bioconcentration (FBC)	
kg (constante cinétique de croissance; jour^{-1}):	Insérer la valeur (IC de 95 %) (1)
k_1 (constante cinétique globale; l kg-1 jour^{-1}):	Insérer la valeur (IC de 95 %) (1)
k_2 (constante cinétique d'élimination globale; jour^{-1}):	Insérer la valeur (IC de 95 %) (1)
k_{2g} (constante cinétique d'élimination globale corrigée de la croissance; jour^{-1}):	Insérer la valeur (IC de 95 %) (1)
C_p (concentration de la substance dans le poisson à l'état-stationnaire; mg kg^{-1}):	Insérer la valeur ± ET (2)
C_e (concentration de la substance dans l'eau à l'état-stationnaire; mg l^{-1}):	Insérer la valeur ± ET (2)
L_n *(facteur de normalisation des lipides*):	Insérer la valeur (3)
FBC_{ES} (FBC à l'état stationnaire; l kg^{-1}):	Insérer la valeur ± ET (2)
FBC_{ESL} (FBC à l'état stationnaire normalisé des lipides; l kg^{-1}):	Insérer la valeur (3) ± ET (2)
FBC_k (FBC cinétique; l *k*g^{-1}):	Insérer la valeur (IC de 95 %) (1)
FBC_{kg} (FBC cinétique corrigé de la croissance; l kg^{-1}):	Insérer la valeur (IC de 95 %) (1)
$t_{1/2g}$ (demi-vie corrigée de la croissance; jour):	Insérer la valeur (IC de 95 %) (1)
FBC_{kL} (FBC cinétique normalisé des lipides; l kg^{-1}):	Insérer la valeur
FBC_{kLg} (FBC cinétique normalisé des lipides et corrigé de la croissance; l kg^{-1}):	Insérer la valeur

(1) IC: intervalle de confiance (quand estimation possible)
(2) ET: écart-type (quand estimation possible)

Il faut éviter de consigner comme résultat «non détecté/quantifié au seuil de détection/quantification» lors de la mise au point de la méthode avant l'essai et à la conception de l'expérience, puisque ces résultats ne peuvent pas servir à calculer les constantes cinétiques.

C.13 — II: **Essai réduit d'exposition des poissons via le milieu aquatique**

INTRODUCTION

L'expérience accumulée dans la conduite et l'interprétation de l'essai complet, que ce soit dans les laboratoires ou au sein des organes de réglementation, montre que — à quelques exceptions près — la cinétique du premier ordre s'applique pour estimer les constantes cinétiques d'absorption et d'élimination. Aussi l'estimation de ces constantes peut-elle se faire avec un minimum de temps d'échantillonnage, et permettre d'obtenir le FBC cinétique.

L'étude d'autres concepts pour analyser le FBC avait pour objectif premier la mise au point d'un petit essai à mettre en œuvre lors d'une étape intermédiaire afin de réfuter ou confirmer les estimations du FBC basées sur K_{oe} et sur les relations structure-activité quantitatives (RSAQ) et se passer ainsi de l'essai

▼M7

complet pour de nombreuses substances chimiques. Il s'agissait aussi de réduire le coût de l'essai et le nombre d'animaux utilisés, en diminuant les prélèvements et les séquences analytiques. Tout en respectant le concept général de la précédente méthode d'essai pour permettre l'intégration des résultats de l'essai aux données existantes sur le FBC et pour améliorer ces résultats et l'interprétation des données, l'objectif était aussi de fournir des estimations du FBC suffisamment précises pour évaluer les risques et prendre les décisions pertinentes. De nombreuses considérations s'appliquent de la même façon que dans l'essai complet, par exemple les critères de validité (voir paragraphe 24) et l'arrêt d'un essai dans le cas où aucune absorption notable n'est observée à l'issue de la phase d'absorption (voir paragraphes 16 et 38).

Les substances pouvant se prêter à ce concept d'essai réduit relèvent du domaine général pour lequel la présente méthode d'essai a été développée, à savoir les substances organiques non polaires (voir paragraphe 49). S'il apparaît que la substance à l'étude se comporte différemment (net écart par rapport à la cinétique du premier ordre, par exemple), il convient, pour respecter la réglementation, de réaliser un essai complet.

En règle générale, l'essai réduit n'est pas réalisé sur une période plus courte que l'essai type concernant le FBC, mais comprend moins de prélèvements de poissons (voir appendice 6 pour l'explication). Néanmoins, la période d'élimination peut être raccourcie pour les substances chimiques à élimination rapide afin d'éviter que les concentrations dans le poisson ne tombent sous le seuil de détection/quantification avant la fin de l'essai. Un essai réduit d'exposition via le milieu aquatique avec une seule concentration, peut servir à déterminer s'il est nécessaire de mener un essai complet; et si les données obtenues pour calculer les constantes cinétiques et le FBC sont fiables (voir paragraphe 93), on peut renoncer à l'essai complet à condition que le FBC obtenu soit loin des valeurs réglementaires critiques.

Dans certains cas, il peut être avantageux de pratiquer l'essai réduit avec plus d'une concentration d'essai, comme un essai préliminaire, pour déterminer si les estimations du FBC pour une substance chimique sont dépendantes de la concentration. Si les estimations du FBC tirées de l'essai réduit sont dépendantes de la concentration, un essai complet s'imposera. Si en revanche, à l'issue d'un essai réduit, les estimations du FBC sont indépendantes de la concentration mais que les résultats sont jugés définitifs, tout essai complet ultérieur pourra être réalisé avec une seule concentration, ce qui réduira le nombre d'animaux utilisés par rapport à un essai complet avec deux concentrations (ou plus).

Les produits chimiques pouvant se prêter à l'essai réduit:

— sont susceptibles de présenter des cinétiques d'absorption et d'élimination du premier ordre approximatives, obtenues par exemple par rapprochement avec des substances similaires;

— présentent un log K_{oe} < 6, à moins qu'un métabolisme rapide ne soit attendu ([1]);

— sont suffisamment hydrosolubles pour la technique d'analyse utilisée (voir paragraphe 24);

— sont clairement quantifiables (les concentrations doivent être environ dix fois plus grandes que le seuil de quantification), dans les poissons et dans l'eau, un marquage radioactif étant recommandé (voir paragraphe 23); et

— il convient soit de prévoir une période d'élimination plus longue que la demi-vie prédite de la substance chimique (voir appendice 5 pour les calculs), soit d'ajuster la durée d'élimination en conséquence (voir paragraphe 91). Une exception à cette règle est autorisée si un métabolisme rapide de la substance est attendu.

([1]) L'essai réduit peut en effet servir à démontrer un métabolisme rapide attendu comme tel.

▼M7

PROGRAMME DE PRÉLÈVEMENT POUR LES ESSAIS RÉALISÉS SUIVANT L'ESSAI RÉDUIT

Prélèvement des poissons

Le prélèvement des poissons est réduit à quatre temps d'échantillonnage:

— Au milieu et à la fin de la phase d'absorption (le dernier prélèvement marque le début de la phase d'élimination), soit par exemple après 14 et 28 jours (33).

— Au milieu de la phase d'élimination et à la fin de l'étude (quand la concentration du produit chimique est < 10 % à la concentration maximale, ou une fois clairement passée au moins une demi-vie du produit chimique), soit par exemple après 7 et 14 jours d'élimination (33). Si une élimination rapide est attendue ou observée, il peut s'avérer nécessaire de raccourcir la période d'élimination afin d'éviter que les concentrations dans le poisson ne tombent sous le seuil de quantification.

— Mesure de la teneur en lipides comme dans l'essai complet.

— Correction de la croissance comme dans l'essai complet.

— Le FBC est calculé comme un FBC cinétique.

Prélèvement de l'eau

Lors de l'essai réduit, l'eau est prélevée comme dans l'essai complet (voir paragraphe 54) ou au moins cinq fois à intervalles réguliers pendant la phase d'absorption et une fois par semaine pendant la phase d'élimination.

Modifications du concept

En fonction des propriétés de la substance d'essai, de la validité des prédictions des RSAQ et de l'objet spécifique de l'étude, il peut être envisageable de modifier le concept de l'essai:

— Si une précision accrue est nécessaire, il est possible d'utiliser plus de poissons (6 ou 8 au lieu de 4) lors du prélèvement réalisé à la fin de la phase d'absorption.

— On inclura un groupe supplémentaire de poissons si après 14 jours (ou à l'issue de la durée prévue de la phase d'élimination) l'élimination n'est pas suffisante (> 50 %). Si la durée prévue de la phase d'élimination est inférieure ou supérieure à 14 jours, il convient d'adapter le programme de prélèvement (un groupe de poissons à l'issue prévue de la phase d'élimination, et un groupe à la moitié de cette phase).

— On utilisera deux concentrations d'essai pour étudier une possible dépendance de la concentration. Si les résultats de l'essai réduit, mené avec deux concentrations d'exposition, montrent que le FBC est indépendant de la concentration (différence inférieure à 20 %), on pourra estimer qu'une concentration d'exposition suffira en cas d'éventuel essai complet.

— Les modèles de processus de bioaccumulation tels que ceux proposés par Arnot *et al.* (35) peuvent probablement aider à prévoir la durée des phases d'absorption et d'élimination (voir aussi l'appendice 5).

Calculs

Les raisons de cette approche tiennent du fait que le facteur de bioconcentration dans un essai complet peut être déterminé comme un facteur de bioconcentration à l'état stationnaire (FBC_{ES}) en calculant le rapport de la concentration de la substance d'essai dans les tissus du poisson à la concentration de la substance d'essai dans l'eau, ou en calculant le facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k), à savoir le rapport de la constante cinétique d'absorption k_1 à la constante cinétique d'élimination k_2. Le FBC_k est valide même si une concentration à l'état stationnaire d'une substance chimique n'est pas atteinte durant

▼M7

l'absorption, à condition qu'absorption et élimination soient régies pour l'essentiel par des processus cinétiques de premier ordre. Au minimum, deux points sont nécessaires pour estimer les constantes cinétiques d'absorption et d'élimination, l'un à la fin de la phase d'absorption (soit au début de la phase d'élimination) et l'autre à la fin de la phase d'élimination (ou une fois la phase d'élimination bien avancée). Le temps d'échantillonnage intermédiaire est recommandé pour contrôler les cinétiques d'absorption et d'élimination ([1]). (Pour les calculs, voir appendices 5 et 6.)

Interprétation des résultats

Pour évaluer la validité et la valeur informative de l'essai, il convient de vérifier que la période d'élimination est supérieure à une demi-vie. De même, on compare le FBC_{km} (FBC cinétique obtenu à partir d'un essai réduit) à la valeur du FBC_{ES} minimisé (qui correspond au FBC_{ES} calculé à la fin de la phase d'absorption, en supposant que l'état stationnaire a été atteint, ce qu'on ne peut que supposer, puisque le nombre de temps d'échantillonnage ne suffit pas à le prouver). Si $FBC_{km} < FBC_{ES}$ minimisé, le FBC_{ES} minimisé sera la valeur à privilégier. Si le FBC_{km} est inférieur à 70 % du FBC_{ES} minimisé, les résultats ne sont pas valides, et un essai complet s'impose.

Si l'essai réduit donne un FBC_{km} avoisinant une valeur réglementaire critique, il faudra mener un essai complet. Si le résultat est loin de toute valeur réglementaire critique (nettement au-dessus ou en-dessous), un essai complet n'est pas forcément nécessaire, ou l'on pourra réaliser un essai complet avec une seule concentration si le cadre réglementaire l'exige.

S'il apparaît à l'issue d'un essai réduit impliquant une seule concentration qu'un essai complet est nécessaire, ce dernier pourra être mené avec une seconde concentration. Si les résultats correspondent, on pourra se passer d'un essai complet avec une concentration différente, puisque la bioconcentration de la substance n'est apparemment pas dépendante de la concentration. Si l'essai réduit a été mené avec deux concentrations et que les résultats ne montrent aucune dépendance de la concentration, on pourra réaliser l'essai complet avec une seule concentration (voir paragraphe 87).

Rapport d'essai

Le rapport de l'essai réduit inclut toutes les informations exigées pour l'essai complet (voir paragraphe 81), à l'exception de celles qu'il n'est pas possible d'obtenir (à savoir la courbe montrant la durée avant l'établissement de l'état stationnaire et le facteur de bioconcentration à l'état stationnaire; à la place de ce dernier, il faudra indiquer le FBC_{ES} minimisé). Il conviendra aussi de préciser les raisons pour lesquelles il a été décidé de mener un essai réduit, et d'indiquer le FBC_{km} obtenu.

C.13 — III: **Essai de bioaccumulation chez le poisson avec exposition via la voie alimentaire**

INTRODUCTION

La méthode décrite dans cette section s'applique pour les substances ne se prêtant pas à un essai par exposition via le milieu aquatique (par exemple parce qu'il n'est pas possible de maintenir des concentrations stables et mesurables dans l'eau ou d'obtenir des charges corporelles adéquates en 60 jours d'exposition; voir les sections précédentes pour la méthode d'exposition en milieu aquatique). Il convient néanmoins de noter que cet essai donnera au final un facteur de bioamplification alimentaire (FBA) et non un facteur de bioconcentration (FBC) ([2]).

En mai 2001, une nouvelle méthode pour les essais de bioaccumulation de substances organiques peu solubles dans l'eau a été présentée lors de la conférence de SETAC Europe, organisée à Madrid (36). Ce travail s'appuie sur différentes études de bioaccumulation rapportées dans la littérature, utilisant une méthode de dosage avec une alimentation enrichie [voir par exemple (37)]. Début 2004, un projet de protocole (38), destiné à mesurer le potentiel

([1]) Si seulement deux points sont mesurés, on pourra estimer le seuil de confiance du FBC_{km} selon les méthodes «bootstrap». Lorsque des points intermédiaires sont également disponibles, le seuil de confiance du FBC_{km} peut être calculé comme dans l'essai complet.

([2]) Voir définitions et unités à l'appendice 1.

▼M7

de bioaccumulation des substances organiques peu hydrosolubles pour lesquelles la méthode de bioconcentration par exposition via le milieu aquatique ne convenait pas, a été soumis, avec un document de référence (39), au groupe de travail PBT de l'UE. Parmi les justifications avancées pour appliquer cette méthode, il a été indiqué que l'exposition potentielle de l'environnement à ces substances peu solubles (log K_{oe} > 5) est sans doute largement liée à la voie alimentaire [voir (40) (41) (42) (43) (44)]. Aussi les essais avec exposition par voie alimentaire sont-ils mentionnés dans certains règlements relatifs aux produits chimiques ([1]). Il convient toutefois de noter que la méthode décrite ici évite soigneusement toute exposition via le milieu aquatique. En conséquence, un FBA obtenu à partir de cette méthode d'essai n'est pas directement comparable à un FBA obtenu avec une étude sur le terrain (qui permet de combiner exposition via le milieu aquatique et par voie alimentaire).

Cette section de la présente méthode d'essai s'appuie sur ce protocole (38) et présente une nouvelle méthode qui ne figurait pas dans la version précédente de la méthode d'essai C.13. Avec cet essai de substitution, il est possible d'étudier directement l'exposition par voie alimentaire dans des conditions de laboratoire bien définies.

Avant de procéder à cette étude, il est indispensable de se reporter aux paragraphes 1 à 14 de la présente méthode d'essai afin de comprendre les circonstances dans lesquelles l'essai avec exposition par voie alimentaire est préféré à l'essai par exposition via le milieu aquatique. Ces paragraphes apportent aussi des informations sur les substances, et il convient d'en prendre connaissance avant de réaliser un essai.

Le marquage radioactif des substances d'essai peut être envisagé pour les mêmes raisons qu'avec la méthode d'exposition via le milieu aquatique (voir paragraphes 6 et 65).

La méthode d'exposition par voie alimentaire peut servir à analyser plusieurs substances lors d'un seul essai, à condition que certains critères soient remplis; ces critères sont détaillés au paragraphe 112. Par souci de simplicité, la méthode décrit ici un essai pratiqué avec une seule substance d'essai.

L'essai avec exposition par voie alimentaire est similaire à l'essai par exposition via le milieu aquatique à de nombreux égards, à l'exception manifeste du mode d'exposition. Aussi la méthode présentée ici recoupe-t-elle en de nombreux points la méthode d'exposition en milieu aquatique décrite à la section précédente. Dans la mesure du possible, il est fait référence aux paragraphes de la section précédente concernés, mais pour des raisons de lisibilité et de compréhension certaines répétitions n'ont pu être évitées.

PRINCIPE DE L'ESSAI

On peut appliquer des conditions d'essai dynamiques ou semi-statiques (voir paragraphe 4); il est recommandé de préférer les essais dynamiques pour limiter l'exposition potentielle à la substance d'essai via le milieu aquatique suite à une désorption de l'alimentation enrichie ou des excréments. L'essai comprend deux phases: l'absorption (substance d'essai-aliments enrichis) et l'élimination (aliments «propres», non traités) (voir paragraphe 16). Durant la phase d'absorption, on donne, tous les jours, à un groupe de poissons des aliments du commerce spécifiquement pour poisson et dont la composition est connue, enrichis de la substance d'essai. Idéalement, les poissons consomment toute la nourriture proposée (voir paragraphe 141). Durant la phase d'élimination, on leur donne cette même nourriture du commerce, mais pure, non traitée. Avec la méthode d'exposition via le milieu aquatique, il est possible, si nécessaire, d'utiliser plus d'un groupe en variant la concentration de la substance d'essai, mais pour la majorité des substances organiques très hydrophobes un groupe d'essai

([1]) Aux fins du règlement (CE) n° 1907/2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH) (JO L 396 du 30.12.2006, p 1), cet aspect est abordé dans le «Guide des exigences d'information et évaluation de la sécurité chimique» qui lui est associé, chapitre R.7c, R.7.10.3.1, R.7.10.4.1, et figure R7.10-2.

▼M7

suffit (voir paragraphes 49 et 107). Dans des conditions semi-statiques, le poisson est transféré dans un nouveau milieu et/ou une nouvelle chambre d'essai à la fin de la phase d'absorption (au cas où le milieu ou l'appareillage utilisé pendant la phase d'absorption aurait été contaminé par la substance d'essai par lixiviation). Les concentrations de la substance d'essai dans le poisson sont mesurées lors des deux phases de l'essai. En plus du groupe de poissons nourris avec une alimentation enrichie (le groupe d'essai), un groupe de poissons témoin est maintenu dans des conditions identiques et nourri de la même façon, mais son alimentation n'est pas enrichie avec la substance d'essai. Ce groupe témoin permet de quantifier la concentration de la substance d'essai dans les poissons non exposés et sert de point de comparaison lorsque l'on observe chez le ou les groupes d'essai des effets nocifs liés au traitement ([1]). Cela permet aussi de comparer les constantes cinétiques de croissance entre les groupes pour contrôler que la nourriture proposée a été consommée dans les mêmes quantités (il convient aussi de tenir compte des qualités organoleptiques potentiellement différentes de l'alimentation pour expliquer la différence entre les constantes cinétiques de croissance; voir paragraphe 138). Il est important que pendant les phases d'absorption et d'élimination, les groupes d'essai et témoin reçoivent une alimentation équivalente.

Une phase d'absorption qui dure entre 7 et 14 jours est généralement suffisante, à en juger par l'expérience des équipes ayant mis au point ces méthodes d'essai (38) (39). Cette durée devrait permettre de minimiser le coût de l'essai tout en garantissant une exposition suffisante pour la plupart des substances. Toutefois, il peut être préférable dans certains cas de prolonger la phase d'absorption (voir paragraphe 127). Durant cette phase d'absorption, la concentration de la substance dans les poissons peut ne pas atteindre l'état stationnaire si bien que le traitement des données et les résultats issus de cette méthode s'appuient en général sur une analyse cinétique des résidus présents dans les tissus. (Note: on peut appliquer ici les équations servant à estimer la durée nécessaire à l'établissement de l'état stationnaire comme lors de l'essai par exposition en milieu aquatique — voir appendice 5). La phase d'élimination commence au moment où l'on nourrit les poissons avec une alimentation non enrichie; elle dure habituellement jusqu'à 28 jours ou, si cela prend moins de temps, jusqu'à ce que la substance d'essai ne soit plus quantifiable dans le poisson (entier). La phase d'élimination peut être raccourcie ou prolongée au-delà de 28 jours, selon les variations dans le temps des concentrations mesurées et de la taille des poissons.

Cette méthode permet de déterminer la demi-vie spécifique à la substance ($t_{1/2}$, d'après la constante cinétique d'élimination, k_2), le rendement d'assimilation (absorption par voie intestinale; α), le facteur de bioamplification alimentaire cinétique (FBA_k), le facteur de bioamplification alimentaire cinétique corrigé de la croissance (FBA_{kg}) et le facteur de bioamplification alimentaire cinétique corrigé de la teneur en lipides ([2]) (FBA_{kL}) (et/ou le facteur de bioamplification alimentaire cinétique corrigé de la croissance et des lipides, FBA_{kgL}) pour la substance d'essai dans le poisson. S'agissant de la méthode d'exposition en milieu aquatique, la prise de poids des poissons durant l'essai provoquera chez eux une dilution de la substance d'essai. Le FBA (cinétique) sera donc sous-estimé s'il n'est pas corrigé en conséquence (voir paragraphes 162 et 163). En outre, si on estime que l'état stationnaire a été atteint en phase d'absorption il est possible de calculer un FBA à l'état stationnaire indicatif. Plusieurs méthodes permettent d'estimer un facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k) à partir des données obtenues dans l'étude par voie alimentaire [par exemple (44) (45) (46) (47) (48)]. Les pour et les contre de ces approches sont analysés à l'appendice 8.

([1]) Pour la plupart des substances d'essai, on ne devrait idéalement rien détecter dans l'eau témoin. Les concentrations naturelles s'expliquent uniquement par la présence logique de matériaux (certains métaux par exemple) et substances omniprésents dans le milieu.

([2]) Le FBA étant défini comme le rapport entre la concentration d'une substance dans un organisme et la concentration de la substance dans l'alimentation de cet organisme à l'état stationnaire, les lipides sont pris en compte dans la mesure où l'on corrige les valeurs obtenues en fonction des lipides présents dans l'organisme et dans l'alimentation, d'où le terme plus précis de «correction». Cette approche diffère de la «normalisation» par rapport à une teneur en lipides donnée dans l'organisme comme cela est fait pour l'essai de bioconcentration par exposition en milieu aquatique.

▼M7

L'essai a été conçu en premier lieu pour les substances organiques non polaires peu hydrosolubles qui sont régies chez les poissons, pour l'essentiel, par des cinétiques d'absorption et d'élimination du premier ordre. Quand la substance testée n'est pas régie par des cinétiques d'absorption et d'élimination du premier ordre, il convient d'employer des modèles plus complexes (voir la bibliographie de l'appendice 5) et de demander conseil à un biostatisticien et/ou pharmacocinéticien.

Normalement, on détermine le FBA en utilisant l'analyse de la substance d'essai pour tout le poisson (poids frais). Si cela est pertinent au regard des objectifs de l'étude, il est possible de prélever des tissus déterminés (par exemple les muscles, le foie) si le poisson est divisé en fractions comestibles et non comestibles (voir paragraphe 21). Par ailleurs, le prélèvement et l'analyse distincte du tractus gastro-intestinal peuvent aider à déterminer la contribution aux concentrations dans l'ensemble du poisson à différents temps d'échantillonnage, à la fin de la phase d'absorption et vers le début de la phase d'élimination, ou dans le cadre d'une approche fondée sur le bilan massique.

La teneur en lipides des poissons (entiers) prélevés est mesurée pour que les concentrations puissent être corrigées en fonction de la teneur en lipides dans l'alimentation et dans le poisson (voir paragraphes 56 et 57, et appendice 7).

Chaque poisson prélevé est pesé, et ce poids est consigné (par exemple en attribuant un identifiant unique à chaque poisson prélevé) et relié à la concentration chimique analysée par individu, afin de calculer le développement du poisson en cours d'essai. Dans la mesure du possible, il convient aussi de mesurer la longueur totale du poisson ([1]). Les données sur le poids sont aussi nécessaires pour estimer le FBC à partir des données relatives à la phase d'élimination durant l'essai avec exposition par voie alimentaire.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

Il convient de disposer des informations sur la substance d'essai décrites aux paragraphes 3 et 22. Une méthode permettant d'analyser les concentrations de la substance d'essai dans l'eau n'est habituellement pas nécessaire; il convient que les méthodes à appliquer présentent une sensibilité appropriée pour mesurer les concentrations dans l'alimentation et dans les tissus du poisson.

La méthode utilisée peut servir à tester plus d'une substance lors d'un même essai. Cependant, il convient que les substances d'essai soient compatibles entre elles: elles ne doivent ni interagir ni changer d'identité chimique une fois ajoutées à l'alimentation du poisson. L'objectif est que les résultats mesurés pour chaque substance lors d'essais groupés ne diffèrent pas ou à peine des résultats qui auraient été obtenus avec des essais individuels. Il convient qu'une analyse préliminaire établisse que chaque substance peut être isolée à partir d'un échantillon de poisson ou de nourriture enrichi de plusieurs substances, avec i) des isolements élevés (par exemple > 85 % à la valeur nominale) et ii) la sensibilité nécessaire au bon déroulement de l'essai. Il convient que la dose totale des substances testées simultanément soit inférieure à la concentration combinée susceptible d'entraîner des effets toxiques (voir paragraphe 51). De plus, il convient que le schéma expérimental prenne en compte les éventuels effets nocifs chez le poisson et les interactions possibles (effets métaboliques) associés à l'essai simultané de plusieurs substances. Il convient d'éviter de tester simultanément des substances ionisables. En termes d'exposition, la méthode se prête aussi à des mélanges complexes (voir paragraphe 13, bien que les limites de l'analyse seront les mêmes qu'avec une autre méthode)).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

La validité de l'essai est subordonnée à la réalisation des conditions suivantes (voir paragraphe 24):

— la variation de la température de l'eau est inférieure à ± 2 °C dans les groupes témoins et dans les groupes traités;

([1]) La longueur totale est aussi être consignée durant l'essai, puisqu'elle constitue un bon indicateur des éventuels effets nocifs observés.

▼M7

— la concentration de l'oxygène dissous reste supérieure ou égale à 60 % de la valeur de saturation de l'air;

— la concentration de la substance d'essai dans l'alimentation des poissons avant et à la fin de la phase d'absorption est comprise dans un intervalle de ± 20 % (sur la base d'au moins trois prélèvements réalisés à ces deux moments);

— la grande homogénéité de la substance dans l'alimentation est démontrée lors d'une analyse préliminaire de l'alimentation enrichie; au moins trois concentrations de la substance mesurées sur des échantillons prélevés au début de l'essai ne varient pas de ± 15 % de la moyenne;

— aucune concentration de la substance d'essai n'est détectée, ou uniquement à l'état de traces habituelles, dans l'alimentation non enrichie ou dans les tissus du poisson témoin;

— la mortalité, les maladies ou d'autres effets nocifs chez les groupes de poissons témoins et testés sont inférieurs ou égaux à 10 % à la fin de l'essai; si l'essai est prolongé pour quelque raison que ce soit, les effets nocifs dans les deux groupes sont inférieurs ou égaux à 5 % par mois, et à 30 % en tout. Des différences significatives de croissance moyenne entre les échantillons du groupe d'essai et du groupe témoin pourraient indiquer un effet toxique de la substance d'essai.

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Si un laboratoire n'a pas procédé à cet essai auparavant ou s'il a procédé à des modifications substantielles (changement de souche ou de fournisseur de poissons, espèce de poisson différente, changement notable de la taille ou de l'alimentation des poissons, ou de la méthode d'enrichissement, etc.), il est conseillé d'éprouver les compétences techniques disponibles, en utilisant une substance de référence. La substance de référence est principalement utilisée pour établir si la technique d'enrichissement de l'alimentation permet de garantir une homogénéité et une biodisponibilité maximales des substances d'essai. Par exemple, la substance de référence utilisée pour les substances hydrophobes non polaires est l'hexachlorobenzène (HCB), mais en raison des propriétés dangereuses du HCB ([1]). il convient de considérer d'autres substances pour lesquelles les données d'absorption et de bioamplification sont fiables. Le cas échéant, les informations générales sur la substance de référence devront figurer dans le rapport d'essai, en particulier le nom, la pureté, le numéro du CAS, la structure, la toxicité (si disponible) comme pour les substances d'essai (voir paragraphes 3 et 22).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

Le matériel et l'appareillage sont utilisés comme décrit pour l'essai par exposition en milieu aquatique (voir paragraphe 26). Il convient d'utiliser un système de renouvellement dynamique ou statique qui fournisse un volume d'eau de dilution suffisant aux récipients d'essai. Il convient aussi de consigner les débits.

Eau

L'eau de l'essai est utilisée comme décrit pour l'essai par exposition en milieu aquatique (voir paragraphes 27 à 29). Il convient que le milieu d'essai présente les caractéristiques requises et que sa qualité reste constante pendant toute la durée de l'essai. La teneur naturelle en particules et en carbone organique total est aussi basse que possible (≤ 5 mg/l pour les matières particulaires; ≤ 2 mg/l pour le carbone organique total) avant le début de l'essai. Le carbone organique total est mesuré uniquement avant l'essai au moment de la caractérisation de l'eau de l'essai (voir paragraphe 53).

([1]) Le HCB figure dans les listes des annexes A et C à la Convention de Stockholm, ainsi que dans les annexes I et III du règlement (CE) n° 850/2004 concernant les polluants organiques persistants (JO L 158 du 30.4.2004, p. 7).

▼M7

Alimentation

Il est recommandé d'utiliser une nourriture pour poisson disponible dans le commerce (granulés flottant et/ou coulant lentement), caractérisée en termes au moins de protéines et riche en matières grasses. Il convient que les granulés présentent une taille uniforme pour accroître l'efficacité de l'exposition par voie alimentaire; de cette façon, les poissons mangeront plus, puisqu'ils ne se contenteront pas de manger les plus gros morceaux, délaissant les plus petits. Il convient aussi que la taille des granulés soit appropriée à la taille des poissons au début de l'essai (diamètre avoisinant 0,6 à 0,85 mm pour les poissons d'une longueur totale comprise entre 3 et 7 cm, et 0,85 à 1,2 mm pour les poissons d'une longueur totale comprise en 6 et 12 cm). On peut ajuster la taille des granulés en fonction du développement des poissons au début de la phase d'élimination. L'appendice 7 donne un exemple d'une nourriture du commerce adaptée. L'alimentation utilisée pour mettre au point cette méthode totalisait en général une teneur en lipides comprise en 15 et 20 % (du poids frais). Il est possible que des aliments pour poisson présentant une teneur en lipides aussi élevée ne soient pas disponibles dans certaines régions. Le cas échéant, l'essai pourrait être réalisé avec une teneur en lipides plus faible et, si nécessaire, d'ajuster la ration alimentaire pour maintenir les poissons en bonne santé (en fonction de l'essai préliminaire). La teneur totale en lipides de l'alimentation du groupe d'essai et du groupe témoin est mesurée et consignée avant le début de l'essai et à la fin de la phase d'absorption. Le rapport d'essai précise les détails fournis par le fabricant des aliments pour poisson dans l'analyse des nutriments, de la teneur en eau, des fibres et de la teneur en cendres, et si possible des minéraux et des résidus de pesticides (polluants prioritaires standard par exemple).

Au moment d'enrichir l'alimentation avec la substance d'essai, il convient de veiller autant que possible à l'homogénéité des aliments utilisés pendant l'essai. La concentration de la substance d'essai dans la nourriture du groupe testé est sélectionnée en fonction de la sensibilité de la technique d'analyse, de la toxicité de la substance d'essai (CSEO si connue) et des données physico-chimiques pertinentes. Le cas échéant, il est préférable d'incorporer la substance de référence suivant une concentration d'environ 10 % de celle de la substance d'essai (ou en tout cas aussi faible que possible), en fonction de la sensibilité de l'analyse (par exemple pour l'hexachlorobenzène, une concentration dans la nourriture de 1 à 100 µg/g est jugée acceptable; voir (47) pour plus d'informations sur les rendements d'assimilation du HCB).

La substance d'essai peut être ajoutée à la nourriture pour poisson de différentes manières, selon ses caractéristiques physiques et sa solubilité (voir annexe 7 pour plus de détails sur les méthodes d'enrichissement):

— si la substance est soluble et stable en triglycérides, la dissoudre dans une petite quantité d'huile de poisson ou d'huile végétale comestible avant de la mélanger à la nourriture pour poisson. Dans ce cas de figure, il convient d'éviter soigneusement de produire une ration trop riche en lipides, en tenant compte de la teneur naturelle en lipides des aliments enrichis et donc en ajoutant la quantité d'huile minimum connue requise pour une répartition homogène de la substance d'essai dans la nourriture, ou;

— enrichir la nourriture avec un solvant organique adapté tant que l'homogénéité et la biodisponibilité ne sont pas compromises [de (micro-)cristaux de la substance d'essai peuvent se former dans les aliments suite à l'évaporation du solvant, sachant qu'il est difficile de prouver que cette évaporation n'a pas eu lieu; voir (49)], ou;

— ajouter des liquides non visqueux directement à la nourriture pour poisson mais en les mélangeant bien pour assurer une répartition homogène et faciliter leur assimilation. Il convient que la technique de mélange garantisse l'homogénéité des aliments enrichis.

▼M7

Dans certains cas, par exemple avec des substances d'essai moins hydrophobes plus susceptibles de se désorber des aliments, il peut être nécessaire d'enduire les granulés d'une petite quantité d'huile de poisson/germes de maïs (voir paragraphe 142). Il convient alors de traiter la nourriture témoin de même et de mesurer la teneur en lipides de la nourriture finale ainsi préparée.

Le cas échéant, les résultats concernant la substance de référence sont comparables aux données des analyses décrites dans la littérature et menées dans des conditions similaires avec une ration alimentaire comparable (voir paragraphe 45), et les paramètres spécifiques à la substance de référence correspondent aux critères pertinents énoncés au paragraphe 113 (3e, 4e et 5e points).

Si une huile ou un solvant est utilisé comme véhicule pour la substance d'essai, on mélange une quantité équivalente de ce véhicule (en excluant la substance d'essai) à la nourriture témoin de façon à maintenir l'équivalence avec les aliments enrichis. Il est important que pendant les phases d'absorption et d'élimination, les groupes d'essai et témoin reçoivent une alimentation équivalente.

La nourriture enrichie est stockée dans des conditions qui maintiennent la stabilité de la substance d'essai au sein du mélange (par réfrigération par exemple) et ces conditions sont consignées.

Sélection des espèces de poissons

Cet essai peut être réalisé avec les espèces de poissons indiquées pour l'exposition en milieu aquatique (voir paragraphe 32 et appendice 3). Avant la publication de la présente méthode d'essai, les études de bioaccumulation par la nourriture menées avec des substances organiques utilisaient habituellement la truite arc-en-ciel (Oncorhynchus mykiss), la carpe (Cyprinus carpio) et le tête-de-boule (Pimephales promelas). Il convient que les espèces testées aient un comportement alimentaire tel que la ration administrée est consommée rapidement pour limiter au maximum l'influence potentielle d'un facteur quel qu'il soit sur la concentration de la substance d'essai dans l'alimentation (par exemple, lixiviation dans l'eau et exposition possible en milieu aquatique). La longueur et le poids des poissons utilisés sont compris dans les limites recommandées (voir appendice 3). Les poissons ne doivent pas être trop petits, ce qui gênerait les analyses par individu. Tester des espèces à une période où elles se développent rapidement peut compliquer l'interprétation des données, des taux de croissance élevés pouvant influer sur le calcul du rendement d'assimilation ([1]).

Conditions de vie des poissons en laboratoire

Les critères relatifs à l'acclimatation, à la mortalité et à d'éventuelles maladies sont les mêmes pour la méthode d'exposition en milieu aquatique (voir paragraphes 33 à 35).

DÉROULEMENT DE L'ESSAI

Étude préliminaire et essai de détermination de l'ordre de grandeur

Une analyse préliminaire est nécessaire pour démontrer la possibilité d'isoler la substance de la nourriture enrichie ou des tissus du poisson. Il n'est pas toujours nécessaire de réaliser un essai de détermination de l'ordre de grandeur pour décider de la concentration appropriée de la substance chimique. Afin de montrer qu'aucun effet nocif n'est observé, d'évaluer les qualités organoleptiques de l'alimentation enrichie, de déterminer la sensibilité de la méthode d'analyse des tissus du poisson et des aliments, et de définir la ration alimentaire et les temps d'échantillonnage appropriés durant la phase d'élimination, etc., on peut procéder à des essais d'alimentation préliminaires, mais ce n'est pas obligatoire. Une étude

([1]) En cas de développement rapide durant la phase d'absorption, la ration alimentaire réelle descendra en-dessous de celle définie au début de l'exposition.

▼M7

préliminaire peut être utile pour estimer le nombre de poissons nécessaires aux prélèvements durant la phase d'élimination. Elle peut permettre de réduire notablement le nombre de poissons utilisés, surtout pour les substances d'essai très sensibles au métabolisme.

Conditions d'exposition

Durée de la phase d'absorption

Une phase d'absorption de 7 à 14 jours est habituellement suffisante; durant cette phase, un groupe de poissons reçoit la nourriture témoin et un autre groupe la nourriture testée. La ration alimentaire qui leur est administrée chaque jour dépend de l'espèce testée et des conditions de l'essai; elle représentera par exemple entre 1 et 2 % du poids du poisson (poids frais) dans le cas de la truite. Cette ration devra être définie de façon à éviter un développement rapide et une augmentation importante de la teneur en lipides. Si besoin, il est possible de prolonger la phase d'absorption en fonction des enseignements tirés d'études antérieures ou des informations connues sur l'absorption ou l'élimination de la substance d'essai (ou analogue) chez le poisson. L'essai proprement dit commence avec la première administration de la nourriture enrichie. Un jour d'essai commence avec l'administration des aliments et se termine peu avant la ration suivante (par exemple une heure avant). Ainsi, en phase d'absorption, le premier jour de l'essai commence avec la première administration de la nourriture enrichie et se termine juste avant la deuxième ration enrichie. En pratique, la phase d'absorption prend fin juste avant (par exemple une heure avant) la première administration de la nourriture non enrichie avec la substance d'essai, sachant que le poisson continue à digérer les aliments enrichis et à absorber la substance d'essai au cours des 24 heures intermédiaires. Il est important de s'assurer que la charge corporelle de la substance d'essai est suffisamment élevée (non-toxique) au regard de la méthode d'analyse appliquée pour pouvoir mesurer une baisse d'au moins une puissance dix durant la phase d'élimination. Dans certains cas, on peut prolonger la phase d'absorption (jusqu'à 28 jours) en réalisant des prélèvements supplémentaires afin d'avoir une idée des cinétiques d'absorption. Pendant l'absorption, la concentration dans le poisson peut ne pas atteindre l'état stationnaire. Pour estimer le temps nécessaire avant atteinte de l'état stationnaire, et avoir ainsi une indication de la durée probable nécessaire avant atteinte de concentrations appréciables dans le poisson, il est possible d'appliquer les équations indiquées pour l'essai par exposition en milieu aquatique (voir appendice 5).

Il arrive que l'on sache à l'avance qu'une durée d'absorption de 7 à 14 jours de la substance chimique dans le poisson ne suffira pas pour que la concentration utilisée dans l'alimentation permette d'atteindre une concentration dans le poisson suffisamment élevée pour analyser une baisse d'au moins une puissance dix durant l'élimination, en raison soit d'une faible sensibilité de la méthode d'analyse soit d'un rendement d'assimilation trop bas. Le cas échéant, il peut être utile d'étendre la phase initiale d'alimentation à plus de 14 jours, ou, surtout s'agissant de substances très métabolisables, d'envisager une concentration dans l'alimentation supérieure. Il convient toutefois de veiller à maintenir la charge corporelle durant l'absorption en-dessous de la concentration sans effet observé (CSEO) chronique (estimée) dans les tissus du poisson (voir paragraphe 138).

Durée de la phase d'élimination

En règle générale, l'élimination dure jusqu'à 28 jours; elle commence dès que l'on donne aux poissons du groupe d'essai une nourriture pure, non traitée, après la phase d'absorption. L'élimination commence avec l'administration de la première ration non enrichie, et non juste après l'administration de la dernière ration enrichie, puisque le poisson continue à digérer les aliments et à absorber la substance d'essai au cours des 24 heures intermédiaires, comme indiqué au paragraphe 126. C'est pourquoi le premier prélèvement de la phase d'élimination est réalisé juste avant la deuxième ration non enrichie. Cette période d'élimination vise à capturer les substances d'une demi-vie potentielle de 14 jours, ce qui correspond aux caractéristiques des substances bioaccumulables ([1]), un essai d'une durée de 28 jours couvre donc deux demi-vies de ces substances. Avec

([1]) Dans le cadre d'une étude avec exposition via le milieu aquatique, une demi-vie de 14 jours correspondrait à un FBC d'environ 10 000 l/kg si on utilisait des poissons de 1 g avec une cinétique d'absorption avoisinant 500 l/kg/j [selon l'équation de Sijm et al. (46)].

▼M7

les substances fortement bioaccumulables, il peut être utile de prolonger la phase d'élimination (si indiqué par l'essai préliminaire).

Si une substance est éliminée très lentement au point qu'on ne peut pas atteindre une demi-vie exacte durant la phase d'élimination, les informations obtenues peuvent néanmoins suffire à indiquer un niveau élevé de bioaccumulation et permettre de réaliser les évaluations. À l'inverse, si une substance est éliminée très rapidement au point qu'on ne peut déduire ni aucune concentration fiable au temps 0 (concentration à la fin de l'absorption ou au début de l'élimination, $C_{0,d}$) ni k_2, on procédera à une estimation basse de k_2 (voir appendice 7).

Si les premières analyses des poissons prélevés (à 7 ou 14 jours par exemple) montrent que la substance chimique a été éliminée en-dessous des niveaux prévus avant la fin de la période complète de 28 jours, on peut annuler les prélèvements suivants et arrêter l'essai.

Dans certains cas, on ne constate aucune absorption mesurable de la substance d'essai à la fin de la période d'absorption (ou avec le deuxième prélèvement de l'élimination). Si l'on peut démontrer que i) les critères de validité énoncés au paragraphe 113 sont satisfaits, et que ii) cette faible absorption n'est pas due à un défaut de l'essai (par exemple durée d'absorption insuffisante, technique d'enrichissement inadéquate entraînant une faible biodisponibilité, sensibilité insuffisante de la méthode d'analyse, non ingestion des aliments par les poissons, etc.), alors il est possible d'arrêter l'étude sans avoir à renouveler l'essai avec une durée d'absorption plus longue. Si au vu de l'étude préliminaire cela semble être le cas, il peut être conseillé, si possible, d'analyser les excréments pour étudier la substance d'essai non digérée suivant une approche fondée sur le bilan massique.

Nombre de poissons testés

Comme pour l'essai par exposition via le milieu aquatique, il convient de sélectionner des poissons de poids et de longueurs similaires, le plus petit d'entre eux ne devant pas peser moins de deux tiers du poids du poisson le plus gros (voir paragraphes 40 à 42).

Le nombre total de poissons utilisés pour l'étude est établi en fonction du programme de prélèvement (au minimum un prélèvement à la fin de la phase d'absorption et entre quatre et six prélèvements pendant la phase d'élimination, selon la durée de chaque phase). Il convient également de prendre en compte la sensibilité de la technique d'analyse, la concentration susceptible d'être atteinte à l'issue de la phase d'absorption (selon les informations disponibles au préalable) et la durée de l'élimination (si les informations disponibles au préalable permettent de l'estimer). Il convient de prélever chaque fois entre cinq et dix poissons et d'en mesurer le développement (poids et longueur totale) avant l'analyse chimique ou lipidique.

En raison de la variabilité inévitable de la taille, du développement et de la physiologie des poissons et de la quantité probablement variable de nourriture ingérée par chacun, il est nécessaire de prélever à chaque temps d'échantillonnage au moins cinq poissons du groupe d'essai et cinq poissons du groupe témoin pour établir de façon appropriée la concentration moyenne et sa variabilité. La variabilité des paramètres à considérer chez les poissons est susceptible d'accroître plus la variabilité générale non maîtrisée de l'essai que la variabilité inhérente aux méthodes d'analyse appliquées, ce qui justifie l'utilisation dans certains cas de jusqu'à dix poissons par prélèvement. Toutefois, si les concentrations de référence de la substance d'essai dans les poissons témoins ne sont pas mesurables au début de l'élimination, l'analyse chimique de deux à trois poissons témoins au dernier temps d'échantillonnage suffira uniquement si l'on continue à prélever les poissons restants du groupe témoin en fonction de leur poids et de leur longueur totale (de façon à prélever chaque fois le même nombre dans les groupes d'essai et témoin pour tenir compte de leur développement). Les poissons sont stockés, pesés individuellement (même s'il s'avère finalement nécessaire de combiner les résultats des prélèvements) et mesurés (longueur totale).

▼M7

Ainsi, un essai type prévoyant une phase d'élimination de 28 jours avec cinq prélèvements nécessitera au total entre 59 et 120 poissons dans le groupe d'essai et entre 50 et 110 poissons dans le groupe témoin, en supposant que la technique d'analyse de la substance permette d'analyser la teneur en lipides sur un même poisson. S'il n'est pas possible d'analyser la substance chimique et la teneur en lipides sur le même poisson et que l'utilisation d'un poisson témoin pour analyser la teneur en lipides n'est pas envisageable (voir paragraphe 56), on devra ajouter 15 poissons (trois du stock de poissons au début de l'essai, trois respectivement du groupe témoin et du groupe d'essai au début de l'élimination et trois respectivement du groupe témoin et du groupe d'essai à la fin de l'expérience). On trouvera un exemple de programme de prélèvement avec les nombres des poissons utilisés à l'appendice 4.

Taux de charge

Les ratios eau/poissons sont aussi élevés qu'avec la méthode d'exposition en milieu aquatique (voir paragraphes 43 et 44). Bien que les taux de charge poissons/eau n'influent pas sur les concentrations d'exposition dans cet essai, il est recommandé d'appliquer un taux de charge compris entre 0,1 et 1,0 g de poisson (poids frais) par litre d'eau et par jour pour maintenir des concentrations adéquates d'oxygène dissous et minimiser le stress de l'essai sur les organismes.

Nourriture testée et alimentation

Durant la période d'acclimatation, les poissons reçoivent une alimentation appropriée (voir paragraphe 117). Si l'essai est réalisé avec un système de renouvellement dynamique, il convient d'interrompre le renouvellement au moment de nourrir les poissons.

Durant l'essai, il convient que l'alimentation du groupe testé soit conforme aux critères décrits précédemment (voir paragraphes 116 à 121). En plus des caractéristiques de la substance testée, de la sensibilité de la méthode d'analyse, de la concentration attendue dans l'alimentation en fonction des conditions environnementales et des niveaux de toxicité chronique/charge corporelle, il convient de tenir compte, pour définir la concentration cible de la substance, des qualités organoleptiques des aliments (qui ne repoussent pas les poissons). La concentration nominale de la substance d'essai est consignée dans le rapport d'essai. D'expérience, les concentrations comprises entre 1 et 1 000 µg/g fournissent une fourchette d'étude adéquate pour les substances qui ne présentent aucun mécanisme toxique spécifique. S'agissant des produits chimiques dont l'action obéit à un mécanisme non spécifique, les résidus présents dans les tissus n'excèdent pas 5 µmol/g de lipides, sinon ils risquent d'entraîner des effets chroniques (19) (48) (50) ([1]). Concernant les autres substances, il convient de s'assurer qu'aucun effet nocif ne résulte de l'exposition cumulée (voir paragraphe 127). Cela est d'autant plus vrai si plusieurs substances sont testées en même temps (voir paragraphe 112).

La quantité adéquate de la substance d'essai peut être ajoutée à la nourriture pour poisson de trois façons (voir paragraphe 119 et appendice 7). Les méthodes et procédures d'enrichissement utilisées sont spécifiées dans le rapport d'essai. Les aliments non traités sont donnés aux poissons témoins; si une huile non enrichie ou un solvant est utilisé comme véhicule dans la nourriture enrichie durant la phase d'absorption, la nourriture non traitée devra contenir une quantité équivalente de cette huile ou être traitée avec ce solvant à l'état pur. Il est nécessaire d'analyser au moins trois échantillons de la concentration de la substance d'essai dans les aliments, traités et non traités, avant le début et à la fin de la phase d'absorption. Après exposition à la nourriture traitée (phase d'absorption), les poissons (des deux groupes) reçoivent de la nourriture non traitée (phase d'élimination).

Les poissons reçoivent une ration déterminée (en fonction de l'espèce; d'environ 1 à 2 % du poids frais par jour dans le cas de la truite). Cette ration alimentaire est déterminée de façon à éviter un développement rapide des poissons et une

([1]) Les concentrations internes réelles ne pouvant être déterminées qu'à l'issue de l'essai, il est nécessaire d'estimer la concentration interne attendue (par exemple en s'appuyant sur le FBA attendu et sur la concentration dans la nourriture; voir à l'appendice 5 l'équation A5.8).

▼M7

hausse importante de la teneur en lipides. Il convient de spécifier dans le rapport les rations administrées tout au long de l'essai. La première ration s'appuie sur les poids mesurés dans le stock de poisson juste avant le début de l'essai. La quantité est ajustée en fonction du poids frais des poissons prélevés aux différents temps prévus, pour tenir compte de leur développement en cours d'essai. Les poids et les longueurs des poissons dans les récipients d'essai et témoins peuvent être estimés à partir des poids et des longueurs totales des poissons utilisés à chaque échantillonnage; il ne faut pas peser ou mesurer le poisson restant dans les récipients d'essai et témoins. Il est important de respecter la ration alimentaire fixée tout au long de l'expérience.

Il convient d'observer l'alimentation des poissons pour s'assurer qu'ils consomment visiblement toute la nourriture présentée et donc que les taux d'ingestion utilisés dans les calculs sont justes. On considérera la pertinence de réaliser des essais d'alimentation préliminaires ou de prendre en compte des expériences antérieures pour déterminer une ration alimentaire qui garantisse que toute la nourriture journalière administrée en une fois est consommée. Quand les poissons laissent systématiquement une partie de cette nourriture, il peut être judicieux de répartir la dose en ajoutant une prise par jour d'essai (même quantité journalière mais divisée par deux et administrée en deux fois au lieu d'une, par exemple). Au besoin, la seconde prise interviendra à un moment précis et sera chronométrée de façon à ce que le maximum de temps possible s'écoule avant le prélèvement des poissons (par exemple, cette seconde prise interviendra pendant la première moitié d'une journée d'essai).

Bien que les poissons consomment en général rapidement la nourriture administrée, il est important de s'assurer que la substance chimique reste adsorbée dans les aliments. On évitera donc que la substance d'essai ne se disperse dans l'eau, ce qui exposerait les poissons à des concentrations aqueuses de la substance d'essai en plus de la voie alimentaire. Pour cela, il convient de retirer les aliments non consommés (et les excréments) des récipients d'essai et témoins dans l'heure voire, de préférence, dans les 30 minutes suivant l'administration. De plus, il est possible d'utiliser un système par lequel l'eau est nettoyée en continu au moyen d'un filtre à charbon actif, qui adsorbe tout contaminant dissous. Les systèmes de renouvellement dynamiques peuvent aider à évacuer rapidement les particules alimentaires et les substances dissoutes ([1]). Parfois, modifier la technique d'enrichissement des aliments peut contribuer à atténuer le problème (voir paragraphe 119).

Lumière et température

Concernant la méthode d'exposition via le milieu aquatique (voir paragraphe 48), une photopériode de 12 à 16 heures est recommandée et la température (± 2 °C) est adaptée à l'espèce testée (voir appendice 3). Il convient de connaître le type et les caractéristiques de l'illumination et de les spécifier dans le rapport.

Témoins

Il convient d'utiliser un groupe témoin auquel on donne la même ration qu'au groupe d'essai mais sans ajouter la substance d'essai à leur nourriture. Si une huile ou un solvant a été utilisé comme véhicule pour enrichir les aliments du groupe d'essai, il faudra traiter la nourriture du groupe témoin exactement de la même façon mais sans ajouter la substance d'essai de façon à ce que l'alimentation des groupes d'essai et témoin soit équivalente (voir paragraphes 121 et 139).

([1]) La présence de la substance d'essai dans le milieu de l'essai à travers les excréments du poisson ou par lixiviation de la nourriture ne peut pas être totalement évitée. Aussi est-il possible par exemple de mesurer la concentration de la substance présente dans l'eau à la fin de la phase d'absorption, surtout si on utilise un système semi-statique, afin d'établir si une exposition en milieu aquatique est intervenue.

▼M7

Fréquence des mesures de la qualité de l'eau

Les conditions décrites pour l'essai par exposition en milieu aquatique s'appliquent ici aussi, à l'exception du fait que le carbone organique total est mesuré uniquement avant l'essai au moment de la caractérisation de l'eau de l'essai (voir paragraphe 53).

Prélèvement et analyse des poissons et alimentation

Analyse des échantillons alimentaires

Au moins trois échantillons de la nourriture d'essai et témoin sont analysés pour déterminer la concentration de la substance d'essai et la teneur en lipides, au minimum avant le début et à la fin de la phase d'absorption. Les méthodes d'analyse et les procédures appliquées pour garantir l'homogénéité de l'alimentation sont spécifiées dans le rapport d'essai.

Il convient d'analyser la substance d'essai dans les échantillons suivant la méthode définie et validée. Une étude préliminaire est réalisée pour établir la limite de quantification, le pourcentage d'isolement, les interférences et la variabilité de l'analyse pour la matrice d'échantillon prévue. Si l'on teste du matériel radiomarqué, on devra considérer les mêmes aspects qu'avec la méthode d'exposition en milieu aquatique, l'analyse des aliments remplaçant l'analyse de l'eau (voir paragraphe 65).

Analyse des poissons

À chaque temps de prélèvement, on prélève entre 5 et 10 individus dans chacun des groupes, témoin et d'essai (dans certains cas, le nombre de poissons témoins peut être réduit; voir paragraphe 134).

Les prélèvements ont lieu, chaque jour de l'expérience, au même moment (en fonction du moment auquel les poissons sont nourris) et sont chronométrés pour réduire au maximum la probabilité que des aliments restent dans les intestins durant la phase d'absorption et au début de la phase d'élimination, et éviter ainsi de fausser les concentrations totales de la substance d'essai (il convient donc de prélever les poissons à la fin d'une journée d'essai, sachant qu'un jour d'essai commence avec l'administration des aliments et se termine juste avant la ration suivante, soit approximativement 24 heures plus tard). L'élimination commence avec la première ration de nourriture «non enrichie» (voir paragraphe 128). Le premier prélèvement de la phase d'élimination (réalisé juste avant la deuxième ration non enrichie) est important, puisqu'il sert à extrapoler la concentration au temps 0, un jour plus tôt, ($C_{0\text{-}d}$, la concentration dans le poisson à la fin de l'absorption/au début de l'élimination). En option, il est aussi possible de prélever et d'analyser séparément le tractus gastro-intestinal du poisson à la fin de l'absorption et aux jours 1 et 3 de l'élimination.

À chaque temps d'échantillonnage, il convient de prélever les poissons des groupes d'essai et témoin et de les traiter de la même façon qu'avec la méthode d'exposition en milieu aquatique (voir paragraphes 61 à 63).

On mesure les concentrations de la substance d'essai dans le poisson (poids frais) au moins à la fin de la phase d'absorption et pendant la phase d'élimination dans les groupes témoin et d'essai. Durant la phase d'élimination, quatre à six temps d'échantillonnage sont recommandés (par exemple aux jours 1, 3, 7, 14 et 28). En option, il est aussi possible d'inclure un temps d'échantillonnage supplémentaire après 1 à 3 jours d'absorption pour estimer le rendement d'assimilation à partir de la phase linéaire de l'absorption, puisqu'encore très proche du début de la période d'exposition. La méthode décrite tolère deux écarts: i) si on prolonge la phase d'absorption pour étudier les cinétiques d'absorption, il faudra prévoir un temps d'échantillonnage supplémentaire durant la phase d'absorption et donc inclure des

▼M7

poissons supplémentaires (voir paragraphe 126); ii) si aucune absorption mesurable n'intervient à la fin de la phase d'absorption, on devra mettre fin à l'essai (voir paragraphe 131). Chaque poisson prélevé est pesé (et sa longueur totale mesurée) pour permettre de déterminer les constantes cinétiques de croissance. On peut aussi mesurer les concentrations de la substance dans des tissus spécifiques du poisson (fractions comestibles et non comestibles) à la fin de l'absorption et à des moments précis de l'élimination. Si l'on teste du matériel radiomarqué, il est nécessaire de considérer les mêmes aspects qu'avec la méthode d'exposition en milieu aquatique, l'analyse des aliments remplaçant l'analyse de l'eau (voir paragraphe 65).

En cas d'utilisation périodique d'une substance de référence (voir paragraphe 25), il est préférable de mesurer les concentrations dans le groupe d'essai à la fin de l'absorption et à tous les temps de l'élimination spécifiés pour la substance d'essai (poisson entier); il convient d'analyser uniquement les concentrations dans le groupe témoin à la fin de l'absorption (poisson entier). Parfois (par exemple quand les techniques d'analyse de la substance d'essai et de la substance de référence sont incompatibles au point qu'il est nécessaire d'utiliser des poissons supplémentaires pour respecter le programme de prélèvement), on pourra appliquer une autre approche pour minimiser le nombre de poissons supplémentaires nécessaires. Les concentrations de la substance de référence sont mesurées pendant l'élimination uniquement aux jours 1, 3 et lors de deux autres temps d'échantillonnage, sélectionnés de manière à obtenir des estimations fiables de la concentration au temps 0 ($C_{0,d}$) et de k_2 pour cette substance de référence.

Si possible, la teneur en lipides de chaque poisson est déterminée à chaque prélèvement, ou au moins au début et à la fin de la phase d'absorption et à la fin de la phase d'élimination (voir paragraphes 56 et 67). Selon la méthode d'analyse retenue (voir paragraphe 67 et appendice 4), il est possible d'utiliser les mêmes poissons pour déterminer la teneur en lipides et la concentration de la substance d'essai. Cela permet de minimiser le nombre de poissons nécessaires. Néanmoins, quand ce n'est pas possible, il convient d'appliquer l'approche décrite pour la méthode d'exposition en milieu aquatique (voir paragraphe 56 les différentes options envisageables pour mesurer la teneur en lipides). La méthode appliquée pour quantifier la teneur en lipides est spécifiée dans le rapport.

Qualité de la méthode d'analyse

Il est nécessaire de mener des essais préliminaires pour s'assurer de la spécificité, de la précision et de la reproductibilité de la technique d'analyse spécifique à la substance, ainsi que de l'isolement de la substance d'essai à partir de l'alimentation et du poisson.

Mesure du développement des poissons

Au début de l'essai, il convient de peser et de mesurer un échantillon de poissons du stock. Ces poissons sont prélevés juste avant la première administration de l'alimentation enrichie (une heure avant par exemple) et assignés au jour d'essai 0. Il convient que le nombre de poissons prélevés soit égal ou supérieur à celui des poissons prélevés ultérieurement pendant l'essai. Il peut s'agir des mêmes poissons utilisés pour l'analyse lipidique réalisée avant le début de la phase d'absorption (voir paragraphe 153). À chaque temps d'échantillonnage, les poissons sont d'abord pesés puis mesurés. Pour chaque poisson, le poids (et la longueur) est relié à la concentration chimique analysée (et s'il y a lieu à la teneur en lipides), par exemple en attribuant un identifiant unique à chaque poisson prélevé. Ces mesures peuvent servir à estimer le poids (et la longueur) des poissons restant dans les récipients d'essai et témoins.

Évaluation de l'essai

Il convient de consigner chaque jour les observations relatives à la mortalité. On observera et enregistrera aussi tout effet nocif, par exemple un comportement anormal ou une pigmentation. Les poissons sont considérés morts en l'absence de mouvement respiratoire ou de réaction à un léger stimulus mécanique. Tout poisson mort ou visiblement moribond devra être retiré.

▼M7

RAPPORT D'ESSAI ET RÉSULTATS

Traitement des résultats

Les résultats des essais sont utilisés pour calculer la constante cinétique d'élimination (k_2) en fonction du poids frais total du poisson. La constante cinétique de croissance, k_g, basée sur la progression moyenne du poids du poisson est calculée et utilisée pour produire la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance, k_{2g}, s'il y a lieu. Il convient en outre de consigner le rendement d'assimilation (a; absorption par voie intestinale), le facteur de bioamplification cinétique (FBA_k) (si nécessaire corrigé de la croissance, FBA_{kg}), sa valeur corrigée des lipides (FBA_{kL} ou FBA_{kgL}, si corrigé de l'effet de dilution par la croissance) et la ration alimentaire. Par ailleurs, s'il est possible d'estimer le temps nécessaire à l'instauration de l'état stationnaire durant la phase d'absorption (par exemple 95 % de l'état stationnaire ou $t_{95} = 3{,}0/k_2$), on pourra inclure une estimation du FBA à l'état stationnaire (FBA_{ES}) (voir paragraphes 105 et 106 et appendice 5) si la valeur t_{95} indique que l'état stationnaire semble atteint. Il convient d'appliquer la même correction lipidique au FBA_{ES} qu'au FBA cinétique (FBA_k) pour obtenir une valeur corrigée de la teneur en lipides, FBA_{ESL} (il n'existe aucune procédure convenue pour corriger un FBA à l'état stationnaire de l'effet de la dilution par la croissance). Les formules et des exemples de calcul sont présentés à l'appendice 7. Plusieurs méthodes permettent d'estimer un facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k) à partir des données obtenues dans l'étude par voie alimentaire. Elles sont discutées à l'appendice 8.

Poids et longueur des poissons

Le poids frais et la longueur de chaque poisson, à chaque temps d'échantillonnage, sont présentés séparément pour les groupes d'essai et les groupes témoins pendant la phase d'absorption [poissons du stock au début de la période d'absorption; groupe témoin et groupe d'essai à la fin de la période d'absorption et, le cas échéant, au début de la période (par exemple jours 1 à 3 de l'absorption) et pendant la phase d'élimination (par exemple jours 1, 2, 4, 7, 14, 28, pour le groupe d'essai et le groupe témoin)]. Le poids est la mesure du développement à privilégier afin de corriger les valeurs de l'effet de dilution par la croissance. Les paragraphes 162 et 163 et l'appendice 5 présentent la ou les méthode(s) utilisée(s) pour cette correction.

Concentration de la substance d'essai dans les poissons

Les mesures des résidus de la substance d'essai réalisées sur chaque poisson (ou sur des échantillons regroupés si des mesures individuelles ne sont pas possibles), exprimées en concentration du poids frais, sont présentées séparément selon les temps d'échantillonnage pour les groupes d'essai et témoins. Si une analyse lipidique a été réalisée sur chacun des poissons prélevés, on calculera et consignera les concentrations individuelles corrigées de la teneur en lipides, exprimées en teneur en lipides du poids frais.

— Les mesures des résidus de la substance d'essai réalisées sur chaque poisson (ou sur des échantillons regroupés si des mesures individuelles ne sont pas possibles, voir paragraphe 66) pour la période d'élimination sont converties dans leurs logarithmes naturels et portées sur un graphique en fonction du temps (jour). Si aucun point aberrant manifeste n'est observé sur le tracé, on pourra appliquer le test du point aberrant statistiquement valide pour supprimer les points parasites et on justifiera dûment leur omission.

— Une corrélation des moindres carrés linéaires est calculée pour ln(concentration) en fonction du temps (jour) d'élimination. La pente et l'ordonnée à l'origine de la droite sont consignées comme la constante cinétique d'élimination globale (k_2) et le logarithme naturel de la concentration au temps 0 ($C_{0,d}$) obtenue (voir annexe 5 et appendice 7 pour plus de détails). Si cela n'est pas possible parce que les concentrations tombent sous la limite de quantification pour le deuxième prélèvement de l'élimination, on peut procéder à une estimation basse de k_2 (voir appendice 7).

— Les écarts de la pente et de l'ordonnée à l'origine de la droite sont calculés en utilisant les procédés statistiques standard, et les intervalles de confiance de 90 % (ou 95 %) autour de ces résultats sont évalués et présentés.

▼M7

— La concentration moyenne mesurée dans le poisson au dernier jour de l'absorption (concentration mesurée au temps 0, $C_{0,m}$) est aussi calculée et comparée à la valeur déduite $C_{0,d}$. Quand la valeur déduite est inférieure à la valeur mesurée, l'écart entre les deux peut indiquer la présence, dans les intestins, d'aliments enrichis non digérés. Si la valeur déduite est nettement supérieure à la valeur mesurée, cela peut signifier que la valeur déduite de la régression linéaire des données d'élimination est erronée et devrait être réévaluée (voir appendice 7).

Vitesse d'élimination et facteur de bioamplification

Pour calculer le facteur de bioamplification, il convient tout d'abord d'obtenir le rendement d'assimilation (absorption de la substance d'essai par voie intestinale, α). Pour cela, il convient d'appliquer l'équation A7.1 à l'appendice 7, qui nécessite de connaître la concentration dans le poisson obtenue au temps 0 de la phase d'élimination ($C_{0,d}$), la constante cinétique d'élimination (globale) (k_2), la concentration dans les aliments (C_{alim}), la constante cinétique d'ingestion (I) et la durée de la phase d'absorption (t). La pente et l'ordonnée à l'origine de la relation linéaire entre ln(concentration) et le temps d'élimination sont consignées comme la constante cinétique d'élimination globale (k_2 = pente) et la concentration au temps 0 ($C_{0,d} = e^{ordonn}$), comme indiqué précédemment. Il convient de contrôler la plausibilité biologique des valeurs obtenues (par exemple, le rendement d'assimilation sous forme de fraction n'est pas supérieur à 1). (I) est calculée en divisant la masse des aliments par la masse du poisson nourri chaque jour (s'il est nourri à 2 % de son poids, (I) sera égal à 0.02). Néanmoins, il peut s'avérer nécessaire d'ajuster la ration alimentaire utilisée dans les calculs en fonction du développement des poissons (en utilisant la constante cinétique de croissance connue pour estimer le poids du poisson à chaque temps de prélèvement durant la phase d'absorption; voir appendice 7). Dans les cas où il n'est pas possible d'obtenir k_2 et $C_{0,d}$ parce que, par exemple, les concentrations ont chuté sous le seuil de détection au moment du deuxième prélèvement d'élimination, on peut procéder à une estimation basse de k_2 et borner FBAk supérieurement (voir appendice 7).

Une fois le rendement d'assimilation (α) obtenu, on peut calculer le facteur de bioamplification en multipliant α par la constante cinétique d'ingestion (I) et en la divisant par la constante cinétique d'élimination (globale) (k_2). Le facteur de bioamplification corrigé de l'effet de dilution par la croissance est calculé de la même façon mais en utilisant la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance (k_{2g}; voir paragraphes 162 et 163). Il est aussi possible d'estimer le rendement d'assimilation si on a analysé les tissus des poissons prélevés lors de la phase initiale linéaire de l'absorption (voir paragraphe 151 et appendice 7). Cette valeur représente une estimation indépendante du rendement d'assimilation pour un organisme quasiment non exposé (à savoir le poisson prélevé au tout début de la phase d'absorption). Le rendement d'assimilation estimé à partir des données de l'élimination sert habituellement à obtenir le FBA.

Correction de la teneur en lipides et correction de la dilution par la croissance

La croissance des poissons pendant la phase d'élimination peut réduire les concentrations chimiques mesurées chez eux, ce qui augmente la constante cinétique d'élimination globale, k_2, par rapport à ce que provoqueraient les processus d'élimination seuls (par exemple métabolisme, égestion) (voir paragraphe 72). La teneur en lipides des poissons d'essai (fortement associée à la bioaccumulation des substances hydrophobes) et la teneur en lipides des aliments peuvent suffisamment varier dans la pratique pour que leur correction soit nécessaire pour obtenir des facteurs de bioamplification qui aient un sens. Le facteur de bioamplification est corrigé de l'effet de dilution par la croissance (comme le FBC cinétique avec la méthode d'exposition en milieu aquatique) et corrigé de la teneur en lipides des aliments en fonction de celle du poisson (le facteur de correction en fonction des lipides). Les appendices 5 et 7 présentent les équations respectives et donnent des exemples de calculs de ce type.

Pour corriger de la dilution par la croissance, il convient de calculer la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance (k_{2g}) (voir appendice 5 pour les

▼M7

équations). Cette constante cinétique d'élimination corrigée (k_{2g}) est utilisée pour calculer le facteur de bioamplification corrigé de la croissance, comme indiqué au paragraphe 73. Dans certains cas, cette méthode n'est pas possible. Une autre méthode contournant la nécessité d'une correction de la dilution par la croissance consiste à utiliser le poids de la substance d'essai par poisson (entier) lors de l'élimination plutôt que le poids de la substance d'essai par unité de masse du poisson (concentration). Ce calcul est facile à faire, car dans le cadre d'essais respectant la présente méthode d'essai, on associe les concentrations tissulaires aux poids individuels des poissons. L'appendice 5 présente la procédure de calcul simple. Il convient de souligner que le recours à cette méthode alternative n'empêche pas qu'il faille estimer et consigner la valeur de k_2.

Pour corriger la teneur en lipides des aliments et du poisson quand l'analyse lipidique n'a pas été réalisée sur tous les poissons prélevés, on déduit les fractions lipidiques moyennes (du poids frais) dans le poisson et dans les aliments ([1]). Le facteur de correction de la teneur en lipides (L_c) est alors calculé en divisant la fraction lipidique moyenne du poisson par la fraction lipidique moyenne des aliments. Le facteur de bioamplification, corrigé de la croissance ou pas, est divisé par le facteur de correction de la teneur en lipides pour calculer le facteur de bioamplification corrigé des lipides.

Si l'analyse chimique et l'analyse lipidique ont été menées sur le même poisson au même temps d'échantillonnage, il convient d'utiliser ces données corrigées des lipides par poisson pour calculer directement un FBA corrigé des lipides [voir (37)]. La courbe de la concentration corrigée en fonction des lipides donne C0,d et k_2. On peut ensuite procéder à une analyse mathématique en utilisant les équations à l'appendice 7, mais le rendement d'assimilation (a) est calculé en utilisant la constante cinétique d'ingestion normalisée par rapport aux lipides ($I_{lipides}$) et la concentration dans l'alimentation en fonction des lipides ($C_{alim-lipides}$). Les paramètres corrigés de la teneur en lipides sont alors utilisés de façon similaire pour calculer le FBA (pour calculer le FBA_{kgL} corrigé de la teneur en lipides et de la croissance, on applique aussi la correction de la constante cinétique de croissance à la fraction lipidique et non au poids frais du poisson).

Interprétation des résultats

La croissance moyenne dans le groupe d'essai et celle dans le groupe témoin en principe ne diffèrent pas beaucoup afin d'exclure les effets toxiques. Les constantes cinétiques de croissance ou les courbes de croissance des deux groupes sont comparées au moyen d'une procédure adaptée ([2]).

Rapport d'essai

Une fois l'étude terminée, il convient de rédiger un rapport final présentant les informations sur la substance d'essai, l'espèce testée et les conditions expérimentales énumérées au paragraphe 81 (pour la méthode d'exposition en milieu aquatique). En outre, ce rapport devra aussi inclure les renseignements suivants:

Substance d'essai:

— Toute information sur la stabilité de la substance d'essai dans la nourriture préparée;

([1]) Cette méthode est spécifique à l'étude fondée sur l'alimentation, et varie de la procédure appliquée pour l'exposition en milieu aquatique; aussi employons-nous le terme «correction» au lieu de «normalisation» afin d'éviter toute confusion — voir aussi la note de bas de page du paragraphe 106.

([2]) On peut réaliser un test t sur les constantes cinétiques de croissance, pour tester si le développement entre les groupes témoins et d'essai varie, ou test F en cas d'analyse des écarts. Si besoin, on peut recourir à un test F ou à un essai fondé sur les rapports de probabilité pour faciliter le choix du modèle de croissance approprié [monographie OCDE n° 54 (32)].

▼M7

Conditions expérimentales:

— La concentration nominale de la substance dans les aliments, la technique d'enrichissement utilisée, la quantité de véhicule (lipides) utilisé pour cet enrichissement (le cas échéant), les concentrations mesurées de la substance d'essai dans l'alimentation enrichie pour chaque analyse (d'au moins trois échantillons, avant le début de l'étude et à la fin de la phase d'absorption) et les valeurs moyennes.

— Le cas échéant, le type et la qualité de l'huile ou du solvant (classe, fabricant, etc.) utilisé pour l'enrichissement.

— Le type de nourriture utilisée (analyse immédiate [1]), classe ou qualité, fabricant, etc.), la ration alimentaire durant la phase d'absorption, la quantité de nourriture administrée et la fréquence (en incluant les ajustements réalisés en fonction du poids des poissons prélevés).

— Le moment auquel les poissons ont été prélevés et euthanasiés pour l'analyse chimique à chaque temps d'échantillonnage (par exemple une heure avant l'administration de la ration du jour suivant).

Résultats:

— Résultats des études préliminaires.

— Informations sur les effets nocifs observés.

— Description complète de tous les procédés d'analyse chimique utilisés, y compris les seuils de détection et de quantification, la variabilité et l'isolement.

— Concentrations lipidiques mesurées dans la nourriture (témoin et enrichie), valeurs individuelles, moyennes et écarts-types.

— Tableau des poids (et longueurs) de chaque poisson des groupes témoin et d'essai (par exemple en attribuant un identifiant unique à chaque poisson prélevé) et calculs, constante(s) cinétique(s) de croissance obtenues et intervalle(s) de confiance de 95 %.

— Tableau des concentrations de la substance d'essai dans les poissons, concentrations moyennes mesurées à la fin de l'absorption ($C_{0,m}$), et constante cinétique d'élimination (globale) obtenue (k_2) et concentration dans le poisson au début de la phase d'élimination ($C_{0,d}$) ainsi que les écarts de ces valeurs (pente et ordonnée à l'origine).

— Tableau des teneurs en lipides par poisson (s'il y a lieu, liste des concentrations de substances spécifiques), valeur moyennes pour les groupes témoin et d'essai au début de l'essai, à la fin de l'absorption et à la fin de l'élimination.

— Courbes (incluant toutes les données mesurées), montrant (s'il y a lieu, les concentrations peuvent être exprimées pour l'animal entier ou des tissus spécifiques):

  — le développement (soit le poids (et la longueur) du poisson en fonction du temps) ou le poids transformé en logarithme naturel en fonction du temps;

[1] Technique d'analyse des aliments s'attachant à la teneur en protéines, en lipides, en cellulose brute et en cendres. Ces informations sont habituellement disponibles auprès du fabricant.

▼M7

— l'élimination de la substance d'essai dans le poisson; et

— la concentration transformée en logarithme naturel (ln concentration) en fonction du temps d'élimination (y compris la constante cinétique d'élimination obtenue k_2, et la concentration dans le poisson déduite du logarithme naturel au début de la phase d'élimination, $C_{0,d}$).

— Si aucun point aberrant manifeste n'est observé sur un tracé, on pourra appliquer le test du point aberrant statistiquement valide pour supprimer les points parasites et on justifiera dûment leur omission.

— Constante cinétique d'élimination et demi-vie calculées corrigées de la croissance.

— Rendement d'assimilation calculé (?).

— FBA alimentaire «brut», FBA cinétique corrigé des lipides et de la croissance («brut» et corrigé des lipides selon le poids frais total du poisson), FBA spécifique à certains tissus s'il y a lieu.

— Toute information concernant les métabolites de la substance d'essai radiomarquée et leur accumulation.

— Toute anomalie concernant l'essai, tout écart à ces modes opératoires et toute autre information pertinente.

— Un tableau synthétisant les données mesurées et calculées pertinentes, comme ci-après:

Constantes cinétiques d'élimination de la substance et facteurs de bioamplification (FBAk)	
k_g (constante cinétique de croissance; jour-1):	Insérer la valeur (IC de 95 %) (1)
k_2 (constante cinétique d'élimination globale, jour-1):	Insérer la valeur (IC de 95 %)
k_{2g} (constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance; jour-1):	Insérer la valeur (IC de 95 %) (1)
$C_{0,m}$ (concentration mesurée au temps 0, concentration dans le poisson à la fin de l'absorption) (µg/g):	Insérer la valeur ± ET (1)
$C_{0,d}$ (concentration obtenue au temps 0 de la phase d'élimination; µg/g):	Insérer la valeur ± ET (2)
I (taux d'ingestion fixé; g de nourriture/g de poisson/jour):	Insérer la valeur
I_g (ration alimentaire effective, ajustée de la croissance; g de nourriture/g poisson/jour) (2)	Insérer la valeur ± ET (2)
C_{alim} (concentration de la substance chimique dans les aliments; µg/g):	Insérer la valeur ± ET (2)
α (rendement d'assimilation de la substance):	Insérer la valeur ± ET (2)
FBA_k (FBA alimentaire cinétique):	Insérer la valeur (IC de 95 %) (1)
FBA_{kg} (FBA alimentaire cinétique corrigé de la croissance):	Insérer la valeur (IC de 95 %) (1)

▼M7

Constantes cinétiques d'élimination de la substance et facteurs de bioamplification (FBAk)	
$t_{1/2g}$ (demi-vie corrigée de la croissance, en jours):	Insérer la valeur ± ET ([2])
Lc (facteur de correction de la teneur en lipides):	Insérer la valeur
FBA_{kgL} (FBA cinétique corrigé de la croissance et des lipides):	Insérer la valeur
FBA_{ES-L} (FBA à l'état stationnaire indicatif corrigé des lipides) ([2])	Insérer la valeur ± ET ([2])

([1]) IC: intervalle de confiance (quand estimation possible)
([2]) ET: écart-type (quand estimation possible)

BIBLIOGRAPHIE

(1) Chapitre C.13 de la présente annexe, Bioconcentration: Essai dynamique chez le poisson.

(2) Chapitre A.6 de la présente annexe, Solubilité dans l'eau.

(3) Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. Environ Toxicol Chem 12: 2031-2035.

(4) Chapitre A.8 de la présente annexe, Coefficient de partage (n-octanol/eau): méthode par agitation en flacon.

(5) Chapitre A.24 de la présente annexe, Cœfficient de partage (n-octanol/eau), méthode HPLC.

(6) Chapitre A.23 de la présente annexe, Coefficient de partage (1-octanol/eau): méthode du brassage lent.

(7) Chapitre C.7 de la présente annexe, Hydrolyse en fonction du pH.

(8) OCDE (1997). Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et l'évaluation, Numéro 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water OCDE/GD(97)21. Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), Paris, France.

(9) Chapitre A.5 de la présente annexe, Tension superficielle des solutions aqueuses.

(10) Chapitre A.4 de la présente annexe, Pression de vapeur.

(11) Chapitre C.4 de la présente annexe, Biodégradabilité facile

(12) Chapitre C.29 de la présente annexe, Biodégradabilité facile — dégagement de CO_2 dans des flacons hermétiquement clos.

(13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102: 117-156.

(14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

(15) OCDE (2011), QSAR Toolbox 2.1. Février 2011. Disponible à l'adresse: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

▼M7

(16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klamer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35: 4097-4102.

(17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to commercially available pelletized fish food. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2058-2062.

(18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2′, 5,5′-tetrachlorobiphenyl. Toxicol. Sci. 77: 206-218.

(19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. Integr. Environ. Assess. Manag. 4: 139-155.

(20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2436-2448.

(21) Schlechtriem C., Fliedner A. et Schäfers C. (2012). Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of LD OCDE 305. Environmental Sciences Europe 2012, 24:13, publié le 3 avril 2012.

(22) Chapitre C.47 de la présente annexe: Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie.

(23) Chapitre C.15 de la présente annexe: Poisson, essai de toxicité à court terme aux stades de l'embryon et de l'alevin.

(24) Chapitre C.14 de la présente annexe: Poisson, essai sur la croissance des juvéniles.

(25) OCDE (2000). Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et l'évaluation, Numéro 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), Paris, France.

(26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, États-Unis.

(27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, États-Unis.

(28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, États-Unis.

(29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.

(30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. Limnol. Oceanogr. 30: 1099-1105.

(31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. Analyst. 124: 1711-1718.

(32) OCDE (2006). Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et l'évaluation, Numéro 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/MONO(2006)18. Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), Paris, France.

▼**M7**

(33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

(34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, États-Unis.

(35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

(36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.

(37) Fisk A.T., Cymbalisty C.D., Bergman Ã. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C_{12}- and C_{16}-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem. 15: 1775-1782.

(38) Anonyme (2004), Fish, dietary bioaccumulation study — Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(39) Anonyme (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, Toxicol. Environ. Chem. 7: 173-189.

(41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. Chemosphere. 14: 829-833.

(42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

(43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. Toxicol. Sci. 77: 219-229.

(44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

(45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. Environ. Sci. Technol. 29: 2769-2777.

(46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

(47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. Environ. Toxicol. Chem. 17: 951-961.

(48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2503-2517.

(49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.

▼**M7**

(50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. Environ. Sci. Technol. 27: 1718-1728.

(51) OCDE (2012), OECD Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et l'évaluation, N° 175: Part I — Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II — Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO(2012)20. Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), Paris, France.

▼M7

Appendice 1

DÉFINITIONS ET UNITÉS

Le rendement d'assimilation (α) est une mesure de la quantité relative de substance absorbée dans l'organisme par les intestins (α n'a pas d'unité, mais est exprimé plus souvent en pourcentage qu'en fraction).

La bioaccumulation renvoie généralement à un processus selon lequel la concentration de la substance chimique dans un organisme atteint un niveau qui excède celle mesurée dans le milieu environnant (par exemple, l'eau pour un poisson ou l'air pour un mammifère), dans la nourriture, ou les deux (1).

La bioconcentration est l'accroissement de la concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme (ou dans un tissu spécifié de ce dernier) par rapport à la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant.

Le facteur de bioconcentration (FBC ou KB) à n'importe quel instant de la phase d'absorption de cet essai d'accumulation est la concentration de la substance d'essai dans ou sur le poisson ou dans un tissu spécifié de ce dernier (C_p en mg/kg) divisée par la concentration de la substance dans le milieu environnant (Ce en mg/l). Le FBC est exprimé en $l \cdot kg^{-1}$. Il convient de noter que les corrections de la croissance et/ou d'une teneur en lipides type ne sont pas prises en compte.

La bioamplification est l'augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme (ou des tissus spécifiques de cet organisme) relative à la concentration de la substance d'essai dans les aliments.

Le facteur de bioamplification (FBA) est la concentration d'une substance chez un prédateur relative à la concentration chez la proie (ou l'alimentation) de ce prédateur à l'état stationnaire. La méthode d'essai décrite ici évite soigneusement toute exposition par le milieu aquatique. En conséquence, un FBA obtenu à partir de cette méthode d'essai n'est pas directement comparable à un FBA obtenu avec une étude sur le terrain (qui permet de combiner exposition en milieu aquatique et par voie alimentaire).

Le facteur de bioamplification alimentaire (FBA alimentaire) est le terme utilisé dans cette méthode d'essai pour décrire le résultat de l'essai avec exposition par voie alimentaire, dans lequel on évite soigneusement toute exposition par le milieu aquatique; le FBA alimentaire obtenu avec cette méthode n'est pas directement comparable à un FBA obtenu avec une étude sur le terrain (qui permet de combiner exposition en milieu aquatique et par voie alimentaire).

La phase d'élimination ou de post-exposition (perte) est la période qui fait suite au transfert des poissons testés d'un milieu contenant la substance d'essai vers un milieu dépourvu de cette substance, période pendant laquelle on étudie l'élimination (ou la perte nette) de la substance par les poissons testés (ou par un tissu spécifié de ces derniers).

La constante cinétique d'élimination (de perte) (k_2) est la valeur numérique qui représente la vitesse de réduction de la concentration de la substance d'essai dans les poissons testés (ou dans un tissu spécifié de ces derniers) à la suite du transfert des poissons testés d'un milieu contenant la substance d'essai vers un milieu dépourvu de cette substance (k_2 est exprimée en $jour^{-1}$).

Le carbone organique dissous (COD) est une mesure de la concentration de carbone provenant de sources organiques dissoutes dans les milieux d'essai.

La phase d'exposition ou d'absorption correspond au temps pendant lequel les poissons sont exposés à la substance d'essai.

Le taux d'ingestion des aliments (I) correspond à la quantité moyenne de nourriture consommée par chaque poisson chaque jour, relative au poids total moyen estimé du poisson (exprimé en g de nourriture/g de poisson/jour).

▼M7

Le facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k) est le rapport entre la constante cinétique d'absorption, k_1, et la constante cinétique d'élimination, k_2 (soit k_1/k_2 — voir dans cette appendice les définitions correspondantes). En principe, la valeur doit être comparable au FBC_{ES} (voir la définition ci-dessus), mais des écarts sont possibles si l'état stationnaire est incertain ou si des corrections de la croissance ont été appliquées au FBC cinétique.

Le facteur de bioconcentration cinétique normalisé des lipides (FBC_{kL}) est normalisé par rapport à un poisson présentant une teneur en lipides de 5 %.

Le facteur de bioconcentration cinétique normalisé des lipides, corrigé de la croissance (FBC_{kgL}) est normalisé par rapport à un poisson présentant une teneur en lipides de 5 % et corrigé de la croissance en cours d'essai comme décrit à l'appendice 5.

Le facteur de bioconcentration à l'état stationnaire normalisé des lipides (FBC_{ESL}) est normalisé par rapport à un poisson présentant une teneur en lipides de 5 %.

Aux fins du règlement REACH, on entend par substance multiconstituants une substance dont plus d'un constituant principal est présent en concentration comprise entre 10 % et 80 % (poids/poids).

Le coefficient de partage n-octanol/eau (K_{oe}) est le ratio de la solubilité d'un produit chimique dans le n octanol et dans l'eau à l'équilibre [méthodes d'essai A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)]; il est aussi représenté par Poe. Le logarithme de K_{oe} est utilisé comme indicateur du potentiel de bioaccumulation de la substance par les organismes aquatiques.

Le carbone organique particulaire (COP) est une mesure de la concentration de carbone provenant de sources organiques en suspension dans les milieux d'essai.

La microextraction en phase solide (MEPS) est une technique d'analyse réalisée sans solvant et développée pour les systèmes dilués. Avec cette méthode, une fibre polymère est exposée à la phase gazeuse ou liquide contenant la substance à analyser. En général, un temps d'analyse minimum est imposé de manière à ce que les conditions d'équilibre soient établies entre les phases solide et fluide, en fonction des espèces testées. Par la suite, la concentration de la substance à analyser peut être déterminée directement à partir de la fibre ou après l'avoir extraite de la fibre dans un solvant, en fonction de la technique de détermination utilisée.

Un état stationnaire est atteint sur la courbe représentant la concentration de la substance d'essai dans un poisson (C_p) par rapport au temps quand cette courbe devient parallèle à l'axe du temps et que les résultats de trois analyses successives de la C_p, réalisées sur des échantillons prélevés à au moins deux jours d'intervalle, ne s'écartent pas de plus de 20 % l'un de l'autre, et qu'on ne constate aucune augmentation notable de la C_p dans le temps entre la première et la dernière analyse successive. Les échantillons regroupés font l'objet d'au moins quatre analyses successives. Pour les substances d'essai qui sont absorbées lentement, il serait plus approprié de prendre des intervalles de sept jours.

La valeur du facteur de bioconcentration à l'état stationnaire (FBC_{ES}) ne varie pas de façon significative pendant une longue période, la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant étant constante pendant cette période (voir la définition de l'état stationnaire).

Le carbone organique total (TOC) est une mesure de la concentration de carbone provenant de toutes les sources organiques dans les milieux d'essai, y compris les sources particulaires et dissoutes.

La constante cinétique d'absorption (k_1) est la valeur numérique qui représente la vitesse d'augmentation de la concentration de la substance d'essai dans ou sur les poissons testés (ou dans un tissu spécifié de ces derniers) lorsque les poissons sont exposés à cette substance (k_1 est exprimé en L kg^{-1} $jour^{-1}$).

Les substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes et matières biologiques sont identifiés par l'abréviation UVCB

▼**M7**

Un produit chimique est une substance ou un mélange.

Un produit chimique d'essai est une substance ou un mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

(2) Chapitre A.8 de la présente annexe, Coefficient de partage (n-octanol/eau): méthode par agitation en flacon

(3) Chapitre A.24 de la présente annexe, Cœfficient de partage (n-octanolng/eau), méthode HPLC.

(4) Chapitre A.23 de la présente annexe, Coefficient de partage (1-octanol/eau): méthode du brassage lent.

▼M7

Appendice 2

QUELQUES CARACTERISTIQUE CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ADMISSIBLE

Substance	Concentration maximale
Matières particulaires	5 mg/l
Carbone organique total	2 mg/l
Ammoniac non ionisé	1 µg/l
Chlore résiduel	10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés	50 ng/l
Chlore organique total	25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arsenic	1 µg/l
Chrome	1 µg/l
Cobalt	1 µg/l
Cuivre	1 µg/l
Fer	1 µg/l
Plomb	1 µg/l
Nickel	1 µg/l
Zinc	1 µg/l
Cadmium	100 ng/l
Mercure	100 ng/l
Argent	100 ng/l

▼M7

Appendice 3

ESPÈCES DE POISSONS RECOMMANDÉES POUR L'ESSAI

Espèces recommandées	Gamme de températures recommandée durant l'essai (°C)	Longueur totale recommandée de l'animal testé (cm) (2)
Danio rerio (1) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Danio zébré	20 — 25	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Tête-de-boule	20 — 25	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Carpe commune	20 — 25	8,0 ± 4,0 (3)
Oryzias latipes (Teleostei, Poecilliidae) (Temminck and Schlegel) Modaka	20 — 25	4,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Guppy	20 — 25	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei Centrarchidae) (Rafinesque) Crapet arlequin	20 — 25	5,0 ± 2,0
Oncorhynchus mykiss (Teleostei Salmonidae) (Walbaum) Truite arc-en-ciel	13 — 17	8,0 ± 4,0
Gasterosteus aculeatus (Teleostei, (Gasterosteidae) (Linnaeus) Épinoche de rivière	18 — 20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer *et al.* (1)

(2) Il est préférable durant l'essai proprement dit de privilégier le poids pour mesurer les écarts des constantes cinétiques de croissance. Néanmoins il est reconnu que la longueur est une mesure plus pratique si le poisson doit être sélectionné à vue au début d'une expérience (au sein du stock de poissons).

(3) Cette fourchette de longueurs est indiquée dans la loi japonaise sur les substances chimiques: Testing Methods for New Chemical Substances etc., based on the Japan's Chemical Substances Control Law (CSCL).

Plusieurs espèces estuariennes et marines ont été utilisées plus rarement, notamment:

Tambour croca (*Leiostomus xanthurus*)

Fondule tête de mouton (*Cyprinodon variegatus*)

Prêtre capucette (*Menidia beryllina*)

Perche méné (*Cymatogaster aggregata*)

Carlottin anglais (*Parophrys vetulus*)

Chabot (*Leptocottus armatus*)

Épinoche de rivière (*Gasterosteus aculeatus*)

Bar (*Dicentracus labrax*)

Ablette (*Alburnus alburnus*)

▼**M7**

Les poissons d'eau douce mentionnés dans le tableau qui précède sont faciles à élever et/ou à se procurer tout au long de l'année, tandis que la disponibilité des espèces marines ou estuariennes est en partie limitée à leurs pays d'origine. Afin d'être en bonne santé et d'ascendance connue, les animaux à tester peuvent être élevés et se reproduire dans des fermes aquacoles ou en laboratoire, où ils sont protégés des maladies et des parasites. Ces poissons se trouvent dans beaucoup de parties du monde.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231-236.

▼M7

Appendice 4

PROGRAMMES DE PRÉLÈVEMENT POUR LES ESSAIS D'EXPOSITION EN MILIEU AQUATIQUE ET PAR VOIE ALIMENTAIRE

1. **Exemple théorique d'un programme de prélèvement pour un essai de bioconcentration avec exposition exclusivement en milieu aquatique pratiqué sur une substance dont le log K_{oe} = 4.**

Prélèvement de poissons	Programme de prélèvement		Nombre d'échantillons d'eau (1)	Nombre de poissons par échantillon (1)
	Fréquence minimale requise (jours) (2)	Prélèvement supplémentaire (jours) (2)		
Phase d'absorption				
1	– 1		2 (3)	4 (4)
	0		(2)	(3 (6))
2	0,3		2	4
		0,4	(2)	(4)
3	0,6		2	4
		0,9	(2)	(4)
4	1,2		2	4
		1,7	(2)	(4)
5	2,4		2	4
		3,3	(2)	(4)
6	4,7		2	4 — 8 (5)
				(3 (6))
Phase d'élimination				Transférer les poissons dans une eau dépourvue de la substance d'essai
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)
10	14,0		2	4 — 8 (5)
		17,5		(4 + 3 (6))
TOTAL				40 — 72 (48 — 80) (5)

(1) Les valeurs entre parenthèses correspondent au nombre d'échantillons (eau, poissons) à prélever lors d'un éventuel prélèvement supplémentaire.

(2) L'estimation avant l'essai du k_2 d'une substance dont le log K_{oe} = 4 s'élève à 0.652 jours^{-1}. La durée totale de l'expérience est fixée à 3 × t_{ES}, soit 3 × 4,6 jours = 14 jours. L'estimation de t_{ES} est présentée à l'appendice 5.

(3) Prélever un échantillon d'eau après que l'équivalent du volume d'au moins trois enceintes ait été versé.

(4) Ces poissons sont prélevés dans le stock de poisson.

(5) Si une précision accrue ou des études de métabolisme sont requises, nécessitant plus de poissons, ces poissons devront être prélevés en particulier à la fin des phases d'absorption et de dépuration (voir paragraphe 40).

(6) Au moins trois poissons supplémentaires pourront être nécessaires pour analyser la teneur en lipides s'il n'est pas possible d'utiliser les poissons prélevés pour mesurer les concentrations de la substance au début de l'essai, à la fin de la phase d'absorption et à la fin de la phase d'élimination. Il convient de noter qu'il devrait être possible dans de nombreux cas d'utiliser seulement les trois poissons témoins (voir paragraphe 56).

▼M7

2. **Exemple théorique d'un programme de prélèvement pour un essai de bioaccumulation de la substance par voie alimentaire avec des phases d'absorption et d'élimination de respectivement 10 et 42 jours.**

Prélèvement de poissons	Programme de prélèvement		Nombre d'échantillons de nourriture	Nombre de poissons par échantillon	
	Jour de la phase	Prélèvements supplémentaires?		Groupe d'essai	Groupe témoin
Phase d'absorption					
1	0	Possible (1) (2)	3 — groupe d'essai	0	5 — 10
			3 — groupe témoin (1)		(8 — 13) (2)
1A (3)	1-3			5 — 10	5 — 10
2	10	Oui (4)	3 — groupe d'essai	10 — 15 (4)	5 — 10
			3 — groupe témoin (1)	(13 — 18) (5)	(8 — 13) (5)
Phase d'élimination					
3	1	Oui (4)		10 — 15 (4)	5 — 10
4	2			5 — 10	5 — 10
5	4			5 — 10	5 — 10
6	7	Oui (4)		10 — 15 (4)	5 — 10
7	14			5 — 10	5 — 10
8	28			5 — 10	5 — 10
9	42	Oui (4)		10 — 15 (4) (13 — 18) (5)	5 — 10 (8 — 13) (5)
TOTAL				59 — 120 (63 — 126) (4) (5)	50 — 110 (56 — 116) (4) (5)

(1) Trois échantillons de nourriture des groupes témoin et d'essai sont analysés pour mesurer les concentrations de la substance d'essai et la teneur en lipides.

(2) Les poissons sont prélevés du stock le plus tard possible avant le début de l'étude; au moins trois poissons du stock sont prélevés au début de l'essai pour mesurer la teneur en lipides.

(3) Le prélèvement (facultatif) au début de la phase d'absorption fournit les données nécessaires pour calculer l'assimilation de la substance d'essai ingérée par voie alimentaire, que l'on peut comparer au rendement d'assimilation calculé à partir des données obtenues lors de la phase d'élimination.

(4) On peut prélever cinq poissons supplémentaires pour l'analyse de tissus spécifiques.

(5) Au moins trois poissons supplémentaires pourront être nécessaires pour analyser la teneur en lipides s'il n'est pas possible d'utiliser les poissons prélevés pour mesurer les concentrations de la substance au début de l'essai, à la fin de la phase d'absorption et à la fin de la phase d'élimination. Il convient de noter qu'il devrait être possible dans de nombreux cas d'utiliser seulement les trois poissons témoins (voir paragraphes 56 et 153).

Note concernant la durée des phases et les temps d'échantillonnage: la phase d'absorption commence avec l'administration de la première ration enrichie. Le premier jour de l'essai commence avec la première administration de nourriture et se termine juste avant la suivante, 24 heures plus tard. Le premier prélèvement (1 dans le tableau) devrait intervenir juste avant la première administration de nourriture (une heure avant par exemple). Idéalement, il faudrait chaque fois prélever les poissons juste avant la ration du jour suivant (soit environ 23 heures après la dernière ration). La phase d'absorption prend fin juste avant la première administration de la nourriture non enrichie, quand la phase d'élimination commence (il est probable que les poissons du groupe d'essai digèrent encore les aliments enrichis dans les 24 heures suivant la dernière administration de nourriture enrichie). Autrement dit, le dernier prélèvement de la phase d'absorption intervient juste avant la première ration non enrichie, et le premier prélèvement de la phase d'élimination intervient environ 23 heures après la première ration non enrichie.

▼M7

Appendice 5

CALCULS GÉNÉRAUX

1. Introduction

2. Prédiction de la durée de la phase d'absorption

3. Prédiction de la durée de la phase d'élimination

4. Méthode séquentielle: détermination de la constante cinétique d'élimination (de perte) k2

5. Méthode séquentielle: détermination de la constante cinétique d'absorption k1 (méthode d'exposition en milieu aquatique uniquement)

6. Méthode simultanée de calcul des constantes cinétiques d'absorption et d'élimination (perte) (méthode d'exposition en milieu aquatique uniquement)

7. Correction de l'effet de dilution par la croissance pour le FBC cinétique et le FBA

8. Normalisation des lipides à 5 % de la teneur en lipides (méthode d'exposition en milieu aquatique uniquement)

1. INTRODUCTION

Le modèle général de bioaccumulation en milieu aquatique chez le poisson peut être décrit en termes de processus d'absorption et de perte, en ignorant l'absorption par voie alimentaire. L'équation différentielle (dC_p/dt) qui décrit la vitesse de modification de la concentration dans le poisson ($mg.kg^{-1}.jour^{-1}$) est donnée avec (1):

$$\frac{dC_p}{dt} = k_1 \times C_e - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_p \qquad \text{[Équation A5.1]}$$

Où

k_1 = Constante cinétique du premier ordre pour l'absorption de la substance chez le poisson ($l\ kg^{-1}.jour^{-1}$).

k_2 = Constante cinétique du premier ordre pour l'élimination de la substance chez le poisson ($jour^{-1}$).

k_g = Constante cinétique du premier ordre pour la croissance du poisson (effet de dilution par la croissance) ($jour^{-1}$)

k_m = Constante cinétique du premier ordre pour la transformation métabolique ($jour^{-1}$)

k_e = Constante cinétique du premier ordre pour l'égestion des excréments ($jour^{-1}$)

C_e = Concentration dans l'eau ($mg \cdot l^{-1}$).

C_p = Concentration dans le poisson ($mg \cdot kg^{-1}$ de poids frais).

S'agissant de substances bioaccumulables, on peut s'attendre à ce qu'une moyenne pondérée par rapport au temps soit la concentration d'exposition dans l'eau (C_e) la plus pertinente au sein de la fourchette de fluctuations autorisée (voir paragraphe 24). Il est recommandé de calculer une moyenne pondérée par rapport au temps de la concentration dans l'eau en suivant les instructions données à l'appendice 6 de la méthode d'essai C.20 (2). Notons que le ln-transformation de la concentration dans l'eau est approprié quand on s'attend à un déclin exponentiel entre les périodes de renouvellement, par exemple dans des conditions d'essai semi-statiques. Avec un système dynamique, le ln-transformation des concentrations d'exposition n'est pas forcément nécessaire. Si on obtient une moyenne pondérée par rapport au temps de la concentration dans l'eau, il convient de la consigner et de l'utiliser dans les calculs suivants.

Dans un essai FBC type réalisé chez des poissons, l'absorption et l'élimination peuvent être décrites en termes de deux processus cinétiques de premier ordre.

▼M7

Cinétique d'absorption = $k_1 \times C_e$ [Équation A5.2]

Cinétique d'élimination globale = $(k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_p$ [Équation A5.3]

À l'état stationnaire, en supposant que le développement et le métabolisme sont négligeables (les valeurs pour k_g et k_m ne peuvent pas être distinguées de zéro), la cinétique d'absorption est égale à la cinétique d'élimination, et donc en combinant les équations A5.2 et A5.3 on obtient la relation suivante:

$$BCF = \frac{C_{p-ES}}{C_{e-ES}} = \frac{k_1}{k_2}$$ [Équation A5.4]

Où

$C_{p\text{-}ES}$ = Concentration dans le poisson à l'état stationnaire (mg kg^{-1} du poids frais).

$C_{e\text{-}ES}$ = Concentration dans l'eau à l'état stationnaire (mg l^{-1}).

Le ratio de k_1/k_2 correspond au FBC cinétique (FBC_k) et devrait être égal au FBC à l'état stationnaire (FBC_{ES}) obtenu à partir du rapport entre la concentration à l'état stationnaire dans le poisson et la concentration à l'état stationnaire dans l'eau, mais des écarts sont possibles si l'état stationnaire est incertain ou si des corrections de la croissance ont été appliquées au FBC cinétique. Néanmoins, k_1 et k_2 étant des constantes, il n'est pas nécessaire que l'état stationnaire soit atteint pour obtenir un FBC_k.

Fondée sur ces équations du premier ordre, cette appendice 5 présente les calculs généraux nécessaires pour les deux méthodes de bioaccumulation, avec exposition en milieu aquatique et exposition par voie alimentaire. Les sections 5, 6 et 8 sont uniquement pertinentes pour la méthode d'exposition en milieu aquatique, mais ont été incluses ici parce qu'elles relèvent de techniques «générales». Les méthodes en mode séquentiel (sections 4 et 5) et simultané (section 6) permettent de calculer les constantes d'absorption et d'élimination qui servent à obtenir les FBC cinétiques. Utilisée pour déterminer k_2 (section 4), la méthode séquentielle est importante pour l'exposition par voie alimentaire, puisqu'elle aide à calculer à la fois le rendement d'assimilation et le FBA. L'appendice 7 détaille les calculs spécifiques à la méthode d'exposition par voie alimentaire.

2. PREDICTION DE LA DUREE DE LA PHASE D'ABSORPTION

Avant de commencer l'essai, on peut estimer k_2 et, par conséquent, un certain pourcentage du temps requis pour atteindre l'état stationnaire, à partir des relations empiriques entre k_2 et le coefficient de partage n-octanol/eau (K_{oe}) ou k_1 et le FBC. Il convient toutefois de tenir compte du fait que les équations présentées dans cette section s'appliquent uniquement quand l'absorption et l'élimination sont régies par une cinétique du premier ordre. Si cela n'est manifestement pas le cas, il est conseillé de demander l'avis d'un biostatisticien et/ou d'un pharmacocinéticien, pour savoir si des prédictions de la durée de la phase d'absorption sont souhaitables.

Plusieurs méthodes permettent d'estimer k_2 ($jour^{-1}$) Par exemple, on pourra utiliser en premier lieu les relations empiriques suivantes ([1]):

$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \log K_{oe}$ ($r^2 = 0{,}95$) [(3); Équation A5.5]

ou

$$k_2 = \frac{k_1}{FBC}$$ [Équation A5.6]

Où $k_1 = 520 \times P^{-0{,}32}$ (pour les substances de log $K_{oe} > 3$) ($r^2 = 0{,}85$)[(4); Équation A5.7]

([1]) Comme pour toute relation empirique, il convient de vérifier que la substance d'essai tombe dans le domaine d'applicabilité de la relation

▼M7

$$\mathrm{Et}FBC = 10^{(0{,}910 \cdot logK_{Oe} - 1{,}975 \cdot log(6{,}8 \cdot 10^{-7} K_{Oe} + 1) - 0{,}786)} \qquad (r^2 = 0{,}90)[(5);\ \text{Équation A5.8}]$$

P= poids moyen du poisson traité (en grammes de poids frais) à la fin de l'absorption/au début de l'élimination ([1])

Pour d'autres relations associées, voir (6). Il peut être avantageux d'employer des modèles plus complexes pour estimer k_2 si, par exemple, il est probable qu'un métabolisme notable intervienne (7) (8). Néanmoins, en raison de la complexité accrue du modèle, on veillera à accorder une attention particulière à l'interprétation des prédictions. Ainsi, la présence de groupes nitro pourrait indiquer un métabolisme rapide, mais ce n'est pas toujours le cas. Aussi l'utilisateur doit-il considérer les résultats de la méthode prédictive au regard de la structure chimique et de toute autre information pertinente (notamment des résultats des études préliminaires) pour programmer une étude.

Le temps nécessaire pour atteindre un certain pourcentage de l'état stationnaire peut être déduit, en appliquant l'estimation de k_2, de l'équation cinétique générale qui décrit l'absorption et l'élimination (cinétique du premier ordre), en supposant que le développement et le métabolisme sont négligeables. En cas de développement substantiel durant l'étude, les estimations décrites ci-dessous ne seront pas fiables. Il est alors préférable d'utiliser la k_{2g} corrigée de la croissance (voir la section 7 de la présente appendice):

$$\frac{dC_p}{dt} = k_1 C_e - k_2 C_p \qquad \text{[Équation A5.9]}$$

ou, si C_e est constante:

$$C_p = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_e(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Équation A5.10]}$$

Lorsqu'on se rapproche de l'état stationnaire ($t \rightarrow \infty$), l'équation A5.10 peut être réduite (*voir.* (9) (10)) à:

$$C_p = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_e \qquad \text{[Équation A5.11]}$$

ou

$$\frac{C_p}{C_e} = \frac{K_1}{K_2} = FBC \qquad \text{[Équation A5.12]}$$

FBC × C_e est donc une approximation de la concentration dans le poisson à l'état stationnaire (C_p ES). [Note: la même approche peut être utilisée pour estimer un FBA à l'état stationnaire lors d'un essai avec exposition par voie alimentaire. Dans ce cas, le FBC est remplacé par le FBA, et la C_e par la C_{alim}, la concentration dans les aliments, dans les équations ci-dessus.]

L'équation A5.10 peut être reformulée de la façon suivante:

$$C_p = C_{p-ES}(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Équation A5.13]}$$

or

$$\frac{C_p}{C_{p-ES}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Équation A5.14]}$$

En appliquant l'équation A5.14, le temps nécessaire à l'obtention d'un certain pourcentage de l'état stationnaire peut être prédit lorsque k_2 est estimée à l'avance à l'aide de l'équation A5.5 ou A5.6.

À titre d'orientation, la durée statistiquement optimale de la phase d'absorption, pour la production de données statistiquement acceptables (FBC_k), est la période requise pour que la courbe du logarithme de la concentration de la

([1]) Le poids des poissons à la fin de la phase d'absorption peut être estimé en fonction des données d'une étude précédente ou des connaissances accumulées sur l'espèce d'essai, dont on sait qu'elle est susceptible de se développer à partir d'un poids au départ de l'essai habituel et sur une durée d'absorption habituelle (par exemple 28 jours).

▼M7

substance d'essai dans le poisson en fonction du temps atteigne au moins 50 % de l'état stationnaire (soit 0,69/k_2), mais pas plus de 95 % de l'état stationnaire (soit 3,0/k_2) (11). Si l'accumulation dépasse 95 % de l'état stationnaire, le calcul d'un FBC_{ES} devient faisable.

Le temps nécessaire pour atteindre 80 % de l'état stationnaire est égal à (en utilisant l'équation A5.14):

$$0{,}80 = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Équation A5.15]}$$

ou

$$t_{80} = \frac{-\ln(0{,}20)}{k_2} = \frac{1{,}6}{k_2} \qquad \text{[Équation A5.16]}$$

De même, le temps pour atteindre 95 % de l'état stationnaire est donné par:

$$t_{95} = \frac{-ln(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2} \qquad \text{[Équation A5.17]}$$

À titre d'exemple, la durée de la phase d'absorption (soit le temps nécessaire à l'obtention d'un certain pourcentage de l'état stationnaire, par exemple t_{80} ou t_{95}) d'une substance d'essai dont le log K_{oe} = 4 atteindrait (en appliquant les équations A5.5, A5.16 et A5.17):

$$log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0{,}652 \text{ jour}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1{,}6}{0{,}652} = 2{,}45\ jours(59 heures)$$

ou $t_{95} = \frac{3{,}0}{0{,}652} = 4{,}60\ jours(110 heures)$

Sinon, la formule suivante:

$$t_{eES} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{oe} + 55{,}31\ (heures) \qquad \text{[Équation A5.18]}$$

peut être utilisée pour calculer le temps nécessaire pour que l'état stationnaire réel (t_{eES}) soit atteint (12). Pour une substance d'essai dont le log K_{oe} = 4 cela donne:

$$t_{eES} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55{,}31 = 121\ heures$$

3. PREDICTION DE LA DUREE DE LA PHASE D'ELIMINATION

Une prédiction du temps requis pour ramener la charge corporelle à un certain pourcentage de la concentration initiale peut aussi être obtenue à partir de l'équation générale qui décrit l'absorption et l'élimination (en supposant une cinétique du premier ordre, voir l'équation A5.9 (1) (13).

En ce qui concerne la phase d'élimination, C_e (or C_{alim} pour l'essai avec exposition par voie alimentaire) est supposée être nulle. L'équation peut donc être réduite à:

$$\frac{dC_p}{dt} = k_2 C_p \qquad \text{[Équation A5.19]}$$

ou

$$C_p = C_{p,0} \cdot e^{-k_2 t} \qquad \text{[Équation A5.20]}$$

où $C_{p,0}$ est la concentration au début de la période d'élimination.

t_{50} correspond au moment où l'élimination aura atteint 50 %:

▼M7

$$\frac{C_p}{C_{p,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

ou

$$t_{50} = \frac{-ln\,(0{,}50)}{k_2} = \frac{0{,}693}{k_2}$$

De même, l'élimination s'élèvera à 95 % à t_{95}:

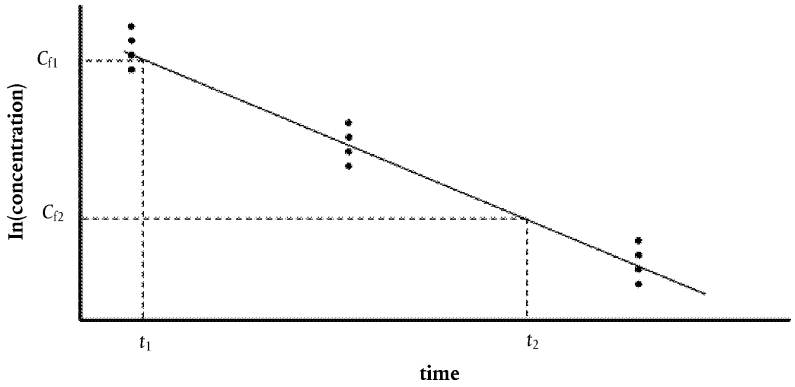
$$t_{95} = \frac{-ln\,(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$

Si on adopte 80 % d'absorption pour la première phase ($1{,}6/k_2$) et une perte de 95 % pour la phase d'élimination ($3{,}0/k_2$), alors la phase d'élimination vaut approximativement le double de la phase d'absorption.

Il convient de noter que les estimations reposent sur l'hypothèse suivant laquelle les processus d'absorption et d'élimination sont régis par une cinétique du premier ordre. Si ces processus n'obéissent manifestement pas à une cinétique du premier ordre, ces estimations ne sont pas valides.

4. METHODE SEQUENTIELLE: DETERMINATION DE LA CONSTANTE CINETIQUE D'ELIMINATION (DE PERTE) K_2

On a fait l'hypothèse que la plupart des données concernant la bioconcentration étaient «raisonnablement» bien décrites par un modèle simple à deux compartiments/deux paramètres, comme le montre la courbe rectiligne qui relie approximativement les points représentant la concentration dans le poisson (sur un graphique logarithmique), pendant la phase d'élimination.



Remarquons que les écarts à la droite peuvent résulter d'un processus d'élimination plus complexe que celui régi par une cinétique du premier ordre. La méthode graphique peut être mise à profit pour traiter les processus d'élimination qui s'écartent d'une cinétique du premier ordre.

Pour calculer k_2 pour des temps de prélèvement multiples, il convient de réaliser une régression linéaire de ln(concentration) par rapport au temps. La pente de la droite de régression est une estimation de la constante cinétique d'élimination k_2 ([1]). À partir de l'ordonnée à l'origine, la concentration moyenne dans le poisson au début de la phase d'élimination ($C0_d$; qui est égale à la concentration moyenne dans le poisson à la fin de la phase d'absorption) peut être facilement calculée (y compris les marges d'erreur) ([2]):

([1]) Dans la plupart des programmes qui permettent une régression linéaire, même les erreurs types et l'intervalle de confiance (IC) des estimations sont donnés, par exemple dans Microsoft Excel avec la commande Analyse des données.

▼M7

$$C_{0,\ d} = e^{ordonn} \qquad \text{[Équation A5.21]}$$

Pour calculer k_2 quand seulement deux temps de prélèvement sont disponibles (comme dans le concept d'essai réduit), il convient de substituer les deux concentrations moyennes dans l'équation suivante

$$k_2 = \frac{\ln\ (C_{pl})\ -\ \ln\ (C_{p2})}{t_{\ 2}\ -t_1} \qquad \text{[Équation A5.22]}$$

Où $\ln(C_{p1})$ et $\ln(C_{p2})$ sont les logarithmes naturels des concentrations aux temps t_1 et t_2, respectivement, et t_2 et t_1 correspondent aux temps auxquels les deux prélèvements ont été réalisés par rapport au début de l'élimination ([1]).

5. METHODE SEQUENTIELLE: DETERMINATION DE LA CONSTANTE CINETIQUE D'ABSORPTION K_1 (METHODE D'EXPOSITION EN MILIEU AQUATIQUE UNIQUEMENT)

Pour trouver une valeur pour k_1 d'après un ensemble de valeurs séquentielles de la concentration en fonction du temps pour la phase d'absorption, il est nécessaire d'utiliser un programme informatique qui corresponde au modèle suivant:

$$C_p(t) = C_e(t)\ \cdot\ \frac{k_1}{k_2}\ \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Équation A5.23]}$$

Où k_2 est donnée par le calcul précédent, $C_p(t)$ et $C_e(t)$ sont les concentrations dans le poisson et dans l'eau, respectivement, au temps t.

Pour calculer k_1 quand seulement deux temps de prélèvement sont disponibles (comme dans le concept d'essai réduit), il convient d'utiliser la formule suivante:

$$k_{\ 1} = \frac{C_{\ p}\ \cdot k_{\ 2}}{C_{\ e}(1\ -\ e^{-k_2 t})} \qquad \text{[Équation A5.24]}$$

Où k_2 est donnée par le calcul précédent, C_p est la concentration dans le poisson au début de la phase d'élimination, et C_e est la concentration moyenne dans l'eau durant la phase d'absorption ([2]).

Pour évaluer la justesse de l'ajustement, on peut procéder à une inspection visuelle des pentes k_1 et k_2 par rapport aux données mesurées aux temps de prélèvement portées sur le graphique. S'il apparaît que la méthode séquentielle fournit une mauvaise estimation pour k_1, il convient d'appliquer la méthode simultanée pour calculer k_1 et k_2 (voir la section 6 ci-après). Une nouvelle fois, pour évaluer la justesse de l'ajustement, il est nécessaire de comparer visuellement les pentes obtenues aux données mesurées portées sur le graphique. Si l'ajustement n'est toujours pas satisfaisant, cela peut signifier que la cinétique du premier ordre ne s'applique pas et qu'il convient d'utiliser des modèles plus complexes.

6. METHODE SIMULTANEE DE CALCUL DES CONSTANTES CINETIQUES D'ABSORPTION ET D'ELIMINATION (PERTE) (METHODE D'EXPOSITION EN MILIEU AQUATIQUE UNIQUEMENT)

Il est possible d'utiliser des programmes informatiques afin de calculer des valeurs pour k_1 et k_2 d'après un ensemble de valeurs séquentielles de la concentration en fonction du temps et le modèle:

$$C_{\ p} = C_{\ e}\ \cdot \frac{k_{\ 1}}{k_{\ 2}}\ \cdot (1 - e^{\ -k_{\ 2} t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[Équation A5.25]}$$

$$C_{\ p} = C_{\ e}\ \cdot \frac{k_{\ 1}}{k_{\ 2}}\ \cdot (e^{\ -k_{\ 2}(t - t_{\ c})}\ -\ e^{\ -k_{\ 2} t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[Équation A5.26]}$$

où

t_c = représente le temps à la fin de la phase d'absorption.

Cette approche fournit directement des erreurs types pour les estimations de k_1 et k_2. Si k_1/k_2 est substituée par le FBC (voir équation A5.4) dans les

([1]) Contrairement à la méthode de régression linéaire, cette formule ne produira pas d'erreur type pour k_2.

([2]) Contrairement à une procédure d'ajustement linéaire, cette méthode ne produit habituellement aucune erreur type ni aucun intervalle de confiance pour la k_1 estimée.

▼M7

équations A5.25 et A5.26, il est possible d'estimer également l'erreur type et l'intervalle de confiance de 95 % du FBC. Cela est particulièrement utile pour comparer des estimations différentes résultant d'une évolution des données. La variable dépendante (concentration dans le poisson) peut être ajustée avec ou sans ln transformation, et l'incertitude quant au FBC obtenu peut être évaluée.

En raison de la forte corrélation entre les deux paramètres k_1 et k_2, s'ils ont été estimés simultanément, on conseille éventuellement de calculer d'abord k_2 à partir des seuls résultats de l'élimination (voir précédemment); dans la plupart des cas, k_2 peut être estimé à partir de la courbe d'élimination avec une précision relativement élevée. Par la suite, k_1 peut être calculée à partir des données d'absorption avec une régression non-linéaire[1]. Il est conseillé de transformer les données de la même façon en cas d'ajustement séquentiel.

Pour évaluer la justesse de l'ajustement, on peut procéder à une inspection visuelle des pentes obtenues en portant sur un graphique les données mesurées aux temps de prélèvement. S'il apparaît que cette méthode fournit une mauvaise estimation pour k_1, il convient d'appliquer l'autre méthode pour calculer k_1 et k_2. Une nouvelle fois, pour évaluer la justesse de l'ajustement, il faudrait comparer visuellement le modèle ajusté aux données mesurées portées sur le graphique, et les estimations des paramètres pour k_1, k_2 et le FBC obtenu ainsi que leurs erreurs types et/ou les intervalles de confiance doivent être comparés selon différents types d'ajustement.

Si l'ajustement n'est toujours pas satisfaisant, cela peut signifier que la cinétique du premier ordre ne s'applique pas et qu'il convient d'utiliser des modèles plus complexes. L'une des complications les plus fréquentes est le développement des poissons durant l'essai.

7. CORRECTION DE L'EFFET DE DILUTION PAR LA CROISSANCE POUR LE FBC CINETIQUE ET LE FBA

Cette section décrit une méthode standard pour corriger les données en fonction du développement des poissons en cours d'essai (autrement dit en fonction de l'effet de dilution par la croissance) qui est uniquement valide quand la cinétique du premier ordre s'applique. Quand il apparaît que la cinétique du premier ordre ne s'applique pas, il est recommandé de demander conseil à un biostatisticien pour bien corriger les données de l'effet de dilution par la croissance; on peut aussi appliquer la méthode fondée sur la masse décrite ci-après.

Dans certains cas, cette méthode de correction de l'effet de dilution par la croissance manque de précision ou ne fonctionne pas (par exemple, pour des substances s'éliminant très lentement testées chez des poissons à croissance rapide, la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance, k_{2g}, peut être très faible, aussi toute erreur commise dans les deux constantes cinétiques servant à la calculer est-elle cruciale, et dans certains cas la k_g estimée peut être supérieure à k_2). Il est alors possible d'utiliser une autre méthode (approche massique), qui évite d'apporter toute correction et fonctionne aussi en l'absence de cinétique du premier ordre. Cette méthode est présentée à la fin de cette section.

Méthode de correction de la croissance par soustraction de la constante cinétique de croissance

Selon la méthode standard, les poids et les longueurs individuels sont convertis en logarithmes naturels, et ln(poids) ou ln(1/poids) sont tracés sur deux graphiques distincts, pour le groupe témoin et le groupe d'essai, en fonction du temps (jour). On procède de même avec les données obtenues séparément pour les phases d'absorption et d'élimination. En général, pour corriger de l'effet de dilution par la croissance, il est plus approprié d'utiliser les poids de l'ensemble de l'étude pour obtenir la constante cinétique de

▼M7

croissance (k_g), mais des écarts notables sur un plan statistique entre les constantes cinétiques de croissance obtenues pour la phase d'absorption et la phase d'élimination peuvent indiquer qu'il convient d'employer la constante cinétique de la phase d'élimination. Les taux de croissance globaux observés lors des études avec exposition en milieu aquatique pour les groupes témoin et d'essai peuvent servir à contrôler les effets associés à tout traitement.

Une corrélation des moindres carrés linéaires est calculée pour ln(poids des poissons) en fonction du temps (jour) (pour ln(1/poids) en fonction du temps) pour chaque groupe (groupes d'essai et témoin, données individuelles, moyennes non journalières) pour l'ensemble de l'étude, les phases d'absorption et d'élimination en appliquant les méthodes statistiques standard. Les écarts des pentes des droites sont calculés et utilisés pour évaluer l'importance statistique (p = 0,05) de la différence entre les pentes (constantes cinétiques de croissance) à partir du test t (ou d'une ANOVA si plus d'une concentration est testée). On préfère en général utiliser les données sur le poids pour les corrections de la croissance. Les longueurs, traitées de la même façon, peuvent servir à comparer les effets du traitement sur les groupes témoin et d'essai. Si on ne constate aucune différence statistiquement notable lors de l'analyse des poids mesurés, on peut regrouper les données des groupes témoin et d'essai et calculer une constante cinétique de croissance du poisson globale pour l'étude (k_g) à savoir la pente globale de la corrélation linéaire. Si on observe des écarts statistiquement notables, on consignera séparément les constantes cinétiques de croissance pour chaque groupe de poissons, et/ou chaque phase de l'essai. La constante cinétique pour chaque groupe traité est alors utilisée pour les corrections de l'effet de dilution par la croissance pour ce groupe. Si on constate des différences statistiques entre les constantes cinétiques d'absorption et d'élimination, il convient d'utiliser les constantes cinétiques tirées de la phase d'élimination.

La constante cinétique de croissance calculée (k_g exprimée en fonction de jour^{-1}) peut être soustraite de la constante cinétique d'élimination globale (k_2) pour donner la constante cinétique d'élimination, k_{2g}.

$$k_{2\ g} = k_2 - k_g \qquad \text{[Équation A5.27]}$$

On divise la constante cinétique d'absorption par la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance pour obtenir le FBC cinétique corrigé de l'effet de dilution par la croissance, représenté par FBC_{Kg} (ou FBA_{Kg}).

$$FBC_{Kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \qquad \text{[Équation A5.28]}$$

La constante cinétique de croissance obtenue pour un essai avec exposition par voie alimentaire est utilisée dans l'équation A7.5 pour calculer le $FBAk_g$ corrigé de la croissance (voir appendice 7).

Méthode de correction de la croissance fondée sur la masse

Il est possible d'utiliser une autre méthode que celle par soustraction de la constante cinétique de croissance, décrite précédemment, pour contourner la nécessité d'une correction de la dilution par la croissance. Le principe consiste à utiliser les données relatives à l'élimination en fonction de la masse par poisson entier et non en fonction de la concentration.

Convertir les concentrations observées dans les tissus lors de la phase d'élimination (masse de la substance d'essai/unité de masse du poisson) en masse de substance d'essai/poisson: mettre en parallèle, sous forme de tableau, les concentrations et les poids de chaque poisson (par exemple en utilisant un tableur informatique) et multiplier chaque concentration par le poids total du poisson pour que cette mesure donne un ensemble de masse de la substance d'essai/poisson pour tous les prélèvements de la phase d'élimination.

Tracer le logarithme naturel obtenu avec les données de la masse de la substance chimique en fonction du temps (phase d'élimination) comme on le ferait normalement.

▼M7

Pour la méthode d'exposition en milieu aquatique, calculer la constante cinétique d'absorption comme d'habitude (voir sections 4 et 6; noter que la valeur k_2 «normale» est utilisée dans les équations d'ajustement de la courbe pour k_1) et déduire la constante cinétique d'élimination des données ci-dessus. La valeur obtenue pour la constante cinétique d'élimination étant indépendante de la croissance, puisqu'elle découle d'une base massique par poisson entier, il convient de la représenter par k_{2g} et non par k_2.

8. NORMALISATION DES LIPIDES A 5 % DE LA TENEUR EN LIPIDES (METHODE D'EXPOSITION EN MILIEU AQUATIQUE UNIQUEMENT)

Les résultats du FBC (cinétique et à l'état stationnaire) des essais par exposition en milieu aquatique sont aussi consignés en fonction d'une teneur en lipides par défaut de 5 % du poids frais des poissons, sauf si l'on peut prouver que la substance d'essai ne s'accumule pas prioritairement dans les lipides (par exemple certaines substances perfluorées peuvent se lier aux protéines). Il convient de convertir les concentrations dans les poissons, ou le FBC, en une teneur en lipides de 5 % par rapport au poids frais. Si les mêmes poissons ont été utilisés pour mesurer les concentrations de la substance et les teneurs en lipides à tous les temps d'échantillonnage, il est nécessaire de corriger les concentrations mesurées individuellement en fonction de la teneur en lipides des poissons.

$$C_{p,L} = \frac{0{,}05}{L} \cdot C_p \qquad \text{[Équation A5.29]}$$

Où

$C_{p,L}$ = concentration dans le poisson normalisée par rapport aux lipides (mg kg^{-1} du poids frais)

L = fraction lipidique (basée sur le poids frais)

C_p = concentration de la substance d'essai dans le poisson (mg kg^{-1} du poids frais)

Si une analyse lipidique n'a pas été menée sur tous les poissons prélevés, on utilisera une valeur lipidique moyenne pour normaliser le FBC. S'agissant du FBC à l'état stationnaire, il convient d'utiliser la valeur moyenne enregistrée à la fin de la phase d'absorption dans le groupe testé. Quant à la normalisation du FBC cinétique il est parfois justifié d'appliquer une méthode différente, par exemple si la teneur en lipides a sensiblement changé pendant la phase d'absorption ou d'élimination. Cependant, il est conseillé de prévoir une ration alimentaire qui réduise au maximum tout changement spectaculaire de la teneur en lipides.

$$FBC_{KL} = \frac{0{,}05}{L_n} \cdot FBC_K \qquad \text{[Équation A5.30]}$$

Où

FBC_{KL} = FBC cinétique normalisé par rapport aux lipides (l kg^{-1})

L_n = fraction lipidique moyenne (basée sur le poids frais)

FBC_K = FBC cinétique (l kg^{-1})

BIBLIOGRAPHIE

(1) Arnot J.A. et Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343–2355.

(2) Chapitre C.20 de la présente annexe, *Daphnia magna, essai de reproduction*.

(3) Spacie A. et Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1: 309-320.

▼**M7**

(4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. et Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

(5) Bintein S., Devillers J. et Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

(6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.

(7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. et Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

(8) OCDE (2011), QSAR Toolbox 2.1. Février 2011. Disponible à l'adresse: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

(9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. et Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2′,4,4′ tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. T. Am. Fish. Soc. 104: 785-792.

(10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals, Sheeman, P., *et al*., Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, États-Unis: 243-255.

(11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. et Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. Can. J. Chem. Eng. 55: 614-622.

(12) Hawker D.W. et Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(13) Konemann H. et van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. Chemosphere. 9: 3-19.

▼M7

Appendice 6

ÉQUATIONS RELATIVES À L'ESSAI PAR EXPOSITION EN MILIEU AQUATIQUE: CONCEPT D'ESSAI RÉDUIT

Les raisons de cette approche tiennent du fait que le facteur de bioconcentration dans un essai complet peut être déterminé comme un facteur de bioconcentration à l'état stationnaire (FBC_{ES}) en calculant le rapport de la concentration de la substance d'essai dans les tissus du poisson à la concentration de la substance d'essai dans l'eau, ou en calculant le facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k), à savoir le rapport de la constante cinétique d'absorption k_1 à la constante cinétique d'élimination k_2. Le FBC_k est valide même si une concentration à l'état stationnaire d'une substance chimique n'est pas atteinte durant l'absorption, à condition qu'absorption et élimination soient régies pour l'essentiel par des processus cinétiques de premier ordre.

Si on mesure la concentration de la substance chimique dans les tissus (C_{p1}) à la fin de l'exposition (t_1) et qu'on mesure cette concentration dans les tissus (C_{p2}) à nouveau après un certain temps (t_2), il est possible d'estimer la constante cinétique d'élimination (k_2) avec l'équation A5.22 de l'appendice 5.

La constante cinétique d'absorption, k_1, peut ensuite être déterminée de manière algébrique avec l'équation A5.23 de l'appendice 5 (où C_p est égale à C_{p1} et t est égal à t_1) (1). Le facteur de bioconcentration cinétique pour le concept d'essai réduit (désigné par FBC_{km} pour le distinguer des facteurs de bioconcentration cinétiques déterminés avec d'autres méthodes) correspond ainsi à:

$$FBC_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \qquad \text{[Équation A6.1]}$$

Il convient de corriger les concentrations ou les résultats de l'effet de dilution par la croissance et de les normaliser par rapport à des poissons présentant une teneur en lipides de 5 % (voir appendice 5).

Le FBC_{ES} minimisé correspond au FBC calculé à la fin de la phase d'absorption, en supposant que l'état stationnaire a été atteint. On ne peut que le supposer, puisque le nombre de temps d'échantillonnage ne suffit pas à le prouver.

$$FBC_{ES} = \frac{C_{p-minES}}{C_{e-minES}} \qquad \text{[Équation A6.2]}$$

Où

$C_{p\text{-}minES}$ = Concentration dans le poisson à un état supposé stationnaire à la fin de l'absorption (mg kg^{-1} du poids frais).

$C_{e\text{-}minES}$ = Concentration dans l'eau à un état supposé stationnaire à la fin de l'absorption (mg l^{-1}).

BIBLIOGRAPHIE

(1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. et Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

▼M7

Appendice 7

ÉQUATIONS RELATIVES À L'ESSAI AVEC EXPOSITION PAR VOIE ALIMENTAIRE

1. Exemple de composition d'une nourriture pour poisson du commerce adaptée

2. Exemples de techniques d'enrichissement de l'alimentation

3. Calcul du rendement d'assimilation et du facteur de bioamplification

4. Correction en fonction de la teneur en lipides

5. Évaluation des différences entre la concentration mesurée au temps 0 (C0,m) et la concentration déduite au temps 0 (C0,d)

6. Orientations pour les substances d'essai s'éliminant très rapidement

1. EXEMPLE DE COMPOSITION D'UNE NOURRITURE POUR POISSON DU COMMERCE ADAPTEE

Composant	Part de l'alimentation
Protéines brutes	≤ 55,0 %
Matière grasse brute	≤ 15,0 % ([1])
Cellulose brute	≥ 2,0 %
Humidité	≥ 12 %
Cendres	≥ 8 %

([1]) Dans certaines régions, il est possible qu'on ne puisse obtenir que de la nourriture pour poisson dont la teneur en lipides est très inférieure à ce plafond. Le cas échéant, il convient de réaliser un essai avec cette teneur en lipides plus faible, et d'ajuster la ration alimentaire pour maintenir les poissons en bonne santé. Il est préférable de ne pas augmenter artificiellement la teneur en lipides de l'alimentation en ajoutant trop d'huile.

2. EXEMPLES DE TECHNIQUES D'ENRICHISSEMENT DE L'ALIMENTATION

Généralités

La nourriture témoin est préparée exactement de la même façon que la nourriture enrichie, mais sans ajout de la substance d'essai.

Pour connaître les concentrations dans les aliments traités, il convient d'extraire trois échantillons de la ration alimentaire selon une méthode d'extraction adaptée, puis de mesurer la radioactivité ou la concentration de la substance d'essai dans ces échantillons. La possibilité d'isoler la substance d'essai à analyser (>85 %) ainsi que la faible variation entre les échantillons (trois concentrations de la substance mesurées sur des échantillons prélevés au début de l'essai ne varient pas de plus de ± 15 % de la moyenne) sont démontrées.

Au cours de l'essai avec exposition par voie alimentaire, il convient de collecter trois échantillons de nourriture au jour 0 et à la fin de la phase d'absorption pour déterminer la concentration de la substance d'essai dans les aliments

Préparation de la nourriture pour poisson avec une substance d'essai liquide (pure)

On fixe une concentration d'essai nominale cible dans la nourriture traitée, par exemple 500 µg de substance d'essai/g de nourriture. La quantité appropriée (en fonction de la masse molaire ou radioactivité spécifique) de la substance d'essai pure est ajoutée à une masse connue de nourriture pour poisson dans un bocal en verre ou un ballon évaporateur rotatif. Il convient que la masse de nourriture suffise pour toute la durée de la phase d'absorption (prendre en

▼M7

compte la nécessité d'augmenter chaque ration en raison du développement des poissons). La nourriture pour poisson et la substance d'essai sont mélangées lentement pendant la nuit (par exemple au moyen d'un mixeur Roto-Rack ou, en cas d'utilisation d'un ballon évaporateur rotatif, par rotation). La nourriture enrichie est stockée dans des conditions qui maintiennent la stabilité de la substance d'essai au sein du mélange (par réfrigération par exemple) jusqu'à son utilisation.

Préparation de la nourriture pour poisson avec un véhicule (huile de poisson/germes de maïs

Les substances d'essai solides sont pilées dans un mortier en une fine poudre. Les substances d'essai liquides peuvent être ajoutées directement à l'huile de poisson ou de germes de maïs. La substance d'essai est dissoute dans une quantité connue d'huile de poisson ou de germes de maïs (par exemple entre 5 à 15 ml). L'huile dosée est transférée dans un ballon d'évaporation rotatif de taille appropriée. La fiole utilisée pour préparer l'huile dosée est nettoyée avec deux petites aliquotes d'huile qu'on ajoute ensuite dans le ballon pour veiller à ce que toute la substance d'essai dissoute soit bien transférée. Afin de garantir la dissolution/dispersion complète dans l'huile (ou si plus d'une substance d'essai est utilisée durant l'essai), on ajoute un micro-agitateur et on bouche la fiole pour que le mélange puisse être agité rapidement pendant la nuit. On ajoute une quantité appropriée de nourriture pour poisson (habituellement sous forme de granulés) dans le ballon, et le contenu du ballon de verre est mélangé de façon homogène par rotation continue du ballon pendant au moins 30 minutes, mais de préférence pendant toute la nuit. La nourriture enrichie est ensuite stockée de manière adéquate (réfrigérée par exemple) pour assurer la stabilité de la substance d'essai dans la nourriture jusqu'à son utilisation.

Préparation de la nourriture pour poisson avec un solvant organique

Une quantité appropriée de la substance d'essai (en fonction de la masse molaire ou radioactivité spécifique) suffisante pour atteindre la dose cible est dissoute dans un solvant organique adéquat (par exemple cyclohexane ou acétone; de 10 à 40 ml, ou un volume plus important si nécessaire, selon la quantité de nourriture à enrichir). Une aliquote, voire la totalité (ajoutée en plusieurs fois), de cette solution est mélangée à la masse appropriée de nourriture pour poisson, de façon à atteindre la dose nominale requise pour l'essai. On peut mélanger la nourriture pour poisson et la substance d'essai dans un récipient en acier inoxydable et laisser la nourriture fraîchement dosée dans ce récipient dans une hotte de laboratoire pendant deux jours (en agitant de temps en temps) pour permettre à l'excès de solvant de s'évaporer; on peut aussi effectuer ce mélange dans un ballon évaporateur à rotation continue. Si besoin, l'excès de solvant peut être retiré au moyen d'un courant d'air ou d'azote. Il convient de veiller à ce que la substance d'essai ne cristallise pas lors du retrait du solvant. Il convient que la nourriture enrichie soit stockée dans des conditions (par réfrigération par exemple) qui maintiennent la stabilité de la substance d'essai au sein du mélange jusqu'à son utilisation.

3. CALCUL DU RENDEMENT D'ASSIMILATION ET DU FACTEUR DE BIOAMPLIFICATION

Pour calculer le rendement d'assimilation, il convient tout d'abord d'estimer la constante cinétique d'élimination globale comme indiqué à la section 4 de l'appendice 5 (avec la méthode séquentielle, c'est-à-dire avec une régression linéaire standard) à partir des concentrations moyennes mesurées dans les échantillons prélevés lors de la phase d'élimination. La constante de la ration alimentaire, I, et la durée d'absorption, t, sont des paramètres connus de l'étude. C_{alim}, la concentration mesurée moyenne de la substance d'essai dans la nourriture, est une variable mesurée lors de l'étude. $C_{0,\text{d}}$, la concentration de la substance d'essai dans le poisson à la fin de la phase d'absorption, est habituellement donnée par l'ordonnée à l'origine sur le tracé de ln(concentration) en fonction du jour d'élimination.

Le rendement d'assimilation de la substance chimique (a, absorption de la substance d'essai par voie intestinale) est calculé comme suit:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{alim}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \qquad \text{[Équation A7.1]}$$

Où:

$C_{0,d}$ = concentration dans le poisson obtenue au temps 0 de la phase d'élimination (mg kg^{-1});

▼M7

k_2 = constante cinétique d'élimination (non corrigée de la croissance) globale (jour^{-1}), calculée avec les équations présentées à l'appendice 5, section 3;

I = constante cinétique d'ingestion (g de nourriture g^{-1} de poisson jour^{-1});

C_{alim} = concentration dans la nourriture (mg kg^{-1} de nourriture);

t = durée de la période d'alimentation (jour)

Néanmoins, il peut s'avérer nécessaire d'ajuster la ration alimentaire, I, utilisée dans les calculs en fonction du développement des poissons pour donner un rendement d'assimilation, a, précis. Dans un essai où les poissons se développent de façon notable pendant la phase d'absorption (durant laquelle on ne corrige jamais la quantité de nourriture afin de maintenir la ration alimentaire fixée), la ration alimentaire réelle à mesure que la phase d'absorption progresse sera inférieure à celle fixée, donnant lieu à un rendement d'assimilation «réel» supérieur. (Cet aspect n'est pas important pour les calculs généraux du FBA, puisque les termes I s'annulent entre les équations A7.1 et A7.4). La ration alimentaire moyenne corrigée de l'effet de dilution par la croissance, I_g, peut être déduite de plusieurs façons, mais une méthode simple et rigoureuse consiste à utiliser la constante cinétique de croissance (k_g) connue pour estimer les poids des poissons testés à certains temps de la phase d'absorption, soit:

$$P_p(t) = P_{p,0} \times e^{k_g \cdot t} \qquad \text{[Équation A7.2]}$$

où

P_p (t) = poids moyen des poissons au jour t de la phase d'absorption

$P_{p,0}$ = poids moyen des poissons au début de l'expérience

De cette manière (au moins), on peut estimer le poids moyen des poissons au dernier jour d'exposition ($P_{p,fin\text{-}absorption}$). La ration alimentaire ayant été fixée par rapport à $P_{p,0}$, la ration alimentaire réelle pour chaque jour d'absorption peut être calculée en utilisant ces deux valeurs relatives au poids. La ration alimentaire corrigée de la croissance, I_g (g de nourriture g^{-1} de poisson jour^{-1}), qu'il convient d'utiliser à la place de I en cas de développement rapide durant la phase d'absorption, peut ensuite être calculée avec:

$$I_g = \frac{I \times P_{p,0}}{P_{p,fin-absorption}} \qquad \text{[Équation A7.3]}$$

Une fois le rendement d'assimilation obtenu, on peut calculer le FBA en le multipliant par la constante de la ration alimentaire I (ou I_g, si cette dernière a servi à calculer α) et en divisant le produit par la constante cinétique d'élimination globale k_2:

$$FBA = \frac{I \times \alpha}{k_2} \qquad \text{[Équation A7.4]}$$

Le facteur de bioamplification corrigé de la croissance est calculé de la même façon, en utilisant la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance (obtenue comme indiquée à la section 7 de l'appendice 5). Une nouvelle fois, si I_g a servi à calculer α, il convient de l'utiliser à la place de I:

$$FBA = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \qquad \text{[Équation A7.5]}$$

Où:

α = rendement d'assimilation (absorption de la substance d'essai par voie intestinale);

k_2 = constante cinétique d'élimination (non corrigée de la croissance) globale (jour^{-1}), calculée avec les équations présentées à l'appendice 5, section 3;

▼M7

k_{2g} = constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance (jour^{-1});

I = constante cinétique d'ingestion (g de nourriture g^{-1} de poisson jour^{-1});

La demi-vie corrigée de la croissance ($t_{1/2}$) est calculée comme suit.

$$t_{1/2} = \frac{0{,}693}{k_{2g}} \qquad \text{[Équation A7.6]}$$

Le rendement d'assimilation de la substance chimique comprise dans la nourriture peut aussi être estimé si les résidus présents dans les tissus sont déterminés durant la phase linéaire de la phase d'absorption (entre les jours 1 et 3). On peut alors déterminer le rendement d'assimilation de la substance (α) comme suit:

$$\alpha = \frac{C_p(t)}{I \times C_{alim} \times t} \qquad \text{[Équation A7.7]}$$

Où

$C_p\ (t)$ = la concentration de la substance d'essai dans le poisson au temps t (mg kg^{-1} de poids frais).

4. CORRECTION EN FONCTION DE LA TENEUR EN LIPIDES

Si la teneur en lipides a aussi été mesurée dans les poissons soumis à l'analyse chimique à tous les temps de prélèvement, alors il convient de corriger les concentrations individuelles en fonction des lipides et de tracer ln(concentration, corrigé de la teneur en lipides) par rapport à l'élimination (jour) pour obtenir $C_{0,d}$ et k_2. Le rendement d'assimilation (équation A7.1) peut ensuite être calculé en fonction des lipides en utilisant C_{alim} (C_{alim} est multipliée par la fraction moyenne de lipides dans la nourriture). Des calculs complémentaires avec les équations A7.4 et A7.5 donneront le FBA corrigé de la teneur en lipides (et de l'effet de dilution par la croissance) directement.

Dans le cas contraire, les fractions lipidiques moyennes (poids frais) dans le poisson et dans les aliments sont déduites pour les deux groupes, témoin et traité (s'agissant de la nourriture et des poissons du groupe témoin, cette fraction est déduite à partir des mesures relevées au début et à la fin de l'exposition; pour le groupe traité, elle découle habituellement des mesures relevées uniquement à la fin de l'exposition). Dans certaines études, la teneur en lipides du poisson peut augmenter sensiblement; il est alors préférable d'appliquer une concentration moyenne des lipides dans le poisson testé calculée à l'aide des valeurs mesurées à la fin de l'exposition et à la fin de l'élimination. En général, les données du groupe d'essai servent uniquement à obtenir les deux fractions lipidiques.

Le facteur de correction de la teneur en lipides (L_c) est calculé ainsi:

$$L_C = \frac{L_p}{L_{alim}} \qquad \text{[Équation A7.8]}$$

Où L_p et L_{alim} sont les fractions lipidiques moyennes respectivement dans le poisson et dans la nourriture.

Le facteur de correction de la teneur en lipides sert à calculer le facteur de bioamplification corrigé par rapport aux lipides (FBA_L):

$$FBA_L = \frac{FBA}{L_C} \qquad \text{[Équation A7.9]}$$

5. ÉVALUATION DES DIFFERENCES ENTRE LA CONCENTRATION MESUREE AU TEMPS 0 ($C_{0,m}$) ET LA CONCENTRATION DEDUITE AU TEMPS 0 ($C_{0,d}$)

Il convient de comparer la concentration mesurée au temps 0 ($C_{0,m}$) et la concentration déduite au temps 0 ($C_{0,d}$). Si elles sont très similaires, le modèle du premier ordre utilisé pour obtenir les paramètres d'élimination semble approprié.

▼M7

Dans certaines études, on observera une différence notable entre la valeur déduite au temps 0, $C_{0,d}$, et la concentration moyenne mesurée au temps 0, $C_{0,m}$ (voir le dernier point du paragraphe 159 de la présente méthode d'essai). Si $C_{0,d}$ est nettement inférieur à $C_{0,m}$ ($C_{0,d} << C_{0,m}$), cet écart peut indiquer la présence, dans les intestins, d'aliments enrichis non digérés. Pour le savoir, on peut analyser séparément des intestins excisés si des poissons (entiers) supplémentaires ont été prélevés et stockés à la fin de la phase d'absorption. Dans le cas contraire, s'il apparaît à l'issue d'un test du point aberrant statistiquement valide appliqué à la régression linéaire de la phase d'élimination que le premier temps d'échantillonnage de l'élimination est erronément élevé, il peut être pertinent de poursuivre la régression linéaire pour obtenir k_2 mais en omettant la concentration au premier temps de l'élimination. Si la régression linéaire semble nettement moins incertaine et que le processus d'élimination semble manifestement régi par une cinétique du premier ordre, il peut être approprié d'utiliser les valeurs $C_{0,d}$ et k_2 obtenues avec le calcul du rendement d'assimilation. Il faudra alors le justifier dûment dans le rapport d'essai. Il est également possible que la phase d'élimination ne soit pas régie par une cinétique du premier ordre. Si cette hypothèse est probable (le logarithme naturel formé à partir des données obtenues semble suivre une courbe par rapport à la droite de la régression linéaire), il est peu probable que les calculs de k_2 et $C_{0,d}$ soient valides, et il est recommandé de demander conseil à un biostatisticien.

Si $C_{0,d}$ est nettement supérieure à la valeur mesurée ($C_{0,d} >> C_{0,m}$) cela peut signifier: que la substance a été éliminée très rapidement (le temps d'échantillonnage se rapproche très tôt de la limite de quantification de la méthode analytique lors de la phase d'élimination, voir la section 6 ci-après); que le processus d'élimination n'est pas régi par une cinétique du premier ordre; que la régression linéaire pour obtenir k_2 et $C_{0,d}$ est erronée; ou qu'un problème concernant les concentrations mesurées lors de l'étude est survenu à certains temps de prélèvement. Il est alors nécessaire d'examiner le tracé de la régression linéaire pour identifier les prélèvements sur ou près de la limite de quantification, les points aberrants et toute courbure manifeste (suggérant une élimination non régie par une cinétique du premier ordre), et de les indiquer clairement dans le rapport d'essai. Toute réévaluation ultérieure de la régression linéaire visant à améliorer les valeurs estimées devra être décrite et justifiée. Si on observe une déviation notable de la cinétique du premier ordre, il est peu probable que les calculs de k_2 et $C_{0,d}$ soient valides, et il est recommandé de demander conseil à un biostatisticien.

6. ORIENTATIONS POUR LES SUBSTANCES D'ESSAI S'ELIMINANT TRES RAPIDEMENT

Comme mentionné au paragraphe 129 de la méthode d'essai, certaines substances s'éliminent si vite qu'il n'est possible de déduire ni une concentration fiable au temps 0, $C_{0,d}$, ni k_2 parce que très tôt durant la phase d'élimination (dès le deuxième prélèvement de l'élimination) la substance n'est plus réellement mesurée (concentrations à la limite de quantification). Cette situation, observée lors de l'essai comparatif interlaboratoires avec du benzo[a]pyrène, a été consignée dans le rapport de validation de cette méthode d'essai. Dans ce cas de figure, il n'est pas possible de poursuivre la régression linéaire de manière fiable, car elle donnerait probablement une estimation exagérément élevée de $C_{0,d}$, d'où un rendement d'assimilation en apparence nettement supérieur à 1. On peut alors procéder à une estimation basse de k_2 et borner le FBA supérieurement.

En utilisant ces points de la phase d'élimination où une concentration a été mesurée, première concentration non détectée incluse (concentration fixée à la limite de quantification), une régression linéaire (fondée sur les concentrations transformées en logarithme naturel par rapport au temps) donnera une estimation de k_2. Cela impliquera souvent uniquement deux points (par exemple les jours de prélèvement 1 et 2 de l'élimination) et k_2 pourra ensuite être estimée avec l'équation A5.22 présentée à l'appendice 5. Cette estimation de k_2 peut servir à estimer un rendement d'assimilation avec l'équation A7.1, en remplaçant dans cette équation la valeur $C_{0,d}$ par la

▼**M7**

concentration mesurée au temps 0 ($C_{0,m}$) quand d'après les estimations $C_{0,d}$ est nettement supérieure à ce que cet essai aurait permis d'atteindre. Si $C_{0,m}$ n'était pas mesurable, il convient d'utiliser le seuil de détection dans les tissus du poisson. Si, dans certains cas, cela donne une valeur $\alpha > 1$, alors un rendement d'assimilation de 1 est supposé être le «pire cas de figure».

Le FBAk maximum peut alors être estimé avec l'équation A7.4 et devra être indiqué comme une valeur «nettement inférieure à» (<<). Par exemple, pour une étude menée avec une ration alimentaire de 3 % et une demi-vie d'élimination inférieure à 3 jours, et un «pire cas de figure» α de 1, le FBAk risque d'être inférieur à environ 0,13. Étant donné l'objet de cette estimation et le fait que les valeurs seront basses par nature, il n'est pas nécessaire de les corriger de l'effet de dilution par la croissance ou de la teneur en lipides dans le poisson ou la nourriture.

▼M7

Appendice 8

MÉTHODES POUR ESTIMER DES FBC PROVISOIRES À PARTIR DES DONNÉES COLLECTÉES DANS L'ÉTUDE AVEC EXPOSITION PAR VOIE ALIMENTAIRE

La méthode d'exposition par voie alimentaire est présentée dans la présente méthode d'essai pour l'essai de bioaccumulation impliquant des substances impossibles à tester avec la méthode d'exposition via le milieu aquatique. La méthode d'exposition via le milieu aquatique donne un facteur de bioconcentration, alors que celle par voie alimentaire fournit directement des informations sur le potentiel de bioamplification de la nourriture. De nombreux plans relatifs à la sécurité des produits chimiques requièrent des informations sur la bioconcentration aquatique (par exemple pour le système d'évaluation des risques ou le Système général harmonisé de classification). Aussi est-il nécessaire d'utiliser les données obtenues avec une étude d'exposition par voie alimentaire pour estimer un facteur de bioconcentration qui soit comparable aux essais menés selon la méthode d'exposition via le milieu aquatique ([1]). Cette section examine différentes approches en ce sens, tout en reconnaissant les limites inhérentes à ces estimations.

L'étude par voie alimentaire mesure l'élimination pour donner une constante cinétique d'élimination, k_2. Si une constante cinétique d'absorption peut être estimée avec les données disponibles quand le poisson a été exposé à la substance d'essai dans l'eau, on pourra estimer un FBC cinétique.

L'estimation d'une constante cinétique d'absorption pour l'exposition via le milieu aquatique à une substance d'essai repose sur de nombreuses hypothèses, toutes contribuant à l'incertitude des estimations. De plus, cette méthode d'estimation d'un FBC suppose que la cinétique d'élimination globale (y compris les facteurs contributifs tels que la répartition dans le corps et les processus d'élimination individuels) est indépendante de la technique d'exposition utilisée pour produire une charge corporelle de la substance d'essai.

On peut résumer les principales hypothèses inhérentes à cette méthode d'estimation comme suit:

L'élimination suivant l'absorption par voie alimentaire procède de même que suivant l'exposition via le milieu aquatique pour une substance donnée

L'absorption par exposition via le milieu aquatique est régie par une cinétique du premier ordre

Selon la méthode utilisée pour estimer l'absorption:

— l'absorption peut être corrélée au seul poids du poisson;

— l'absorption peut être corrélée au seul coefficient de partage octanol-eau de la substance;

— l'absorption peut être corrélée à une combinaison du poids du poisson et du coefficient de partage octanol-eau de la substance

— les facteurs pouvant affecter l'absorption lors d'un essai par exposition en milieu aquatique tels que la biodisponibilité de la substance, l'adsorption vers l'appareillage, la taille moléculaire etc. ont peu d'impact

— et, surtout:

La base de données utilisée pour développer la méthode d'estimation de l'absorption est représentative de la substance considérée

Plusieurs publications dans la littérature ont déduit des équations faisant le rapprochement entre l'absorption, depuis le milieu aquatique, de la substance par les branchies et un coefficient de partage octanol-eau de la substance, le poids du poisson (1) (2) (3) (4), le volume et/ou la teneur en lipides, l'imprégnation/diffusion par les membranes (5) (6), le volume de ventilation du poisson (7) et par une approche fugacité/bilan massique (8) (9) (10). Ces méthodes,

([1]) Dans la nature, l'ingestion est probablement le meilleur moyen d'exposer au maximum des poissons à des substances très hydrophobes dans un milieu aquatique; ainsi, un FBC estimé n'est pas strictement représentatif du potentiel de bioaccumulation d'une telle substance.

▼M7

appliquées dans ce contexte, sont évaluées en détail par Crookes et Brooke (11). Une publication de Barber (12), qui s'est attaché à modéliser la bioaccumulation associée à l'absorption par voie alimentaire, s'avère aussi utile dans ce contexte, puisqu'elle inclut les contributions de modèles de cinétique d'absorption par les branchies. Une section dans le document de référence du protocole de 2004 (13) est aussi consacrée à cet aspect.

Pour la plupart, ces modèles semblent dériver de bases de données limitées. S'agissant des modèles dont les bases de données sont présentées en détail, il semble que les types de substances utilisés présentent souvent une structure similaire ou relèvent de la même classe (en termes de fonctionnalité, par exemple les composés organochlorés). Cela ajoute à l'incertitude qu'il y a à utiliser un modèle dans le but de prédire une constante cinétique d'absorption pour un type de substance différent, sans parler des considérations spécifiques à l'essai comme l'espèce testée, les températures en présence, etc.

Une synthèse des techniques disponibles (11) montre qu'aucune méthode n'est «plus juste» que les autres. Aussi convient-il de justifier clairement le choix du modèle utilisé. Quand plusieurs méthodes sont justifiées, il est prudent de présenter plusieurs estimations de k_1 (et donc du FBC) ou une fourchette de valeurs pour k_1 (et pour le FBC) selon les différentes méthodes d'estimation d'absorption possibles. Néanmoins, étant donné les différences entre les types de modèle et les bases de données utilisées pour les développer, il ne serait pas approprié de prendre une moyenne des estimations obtenues avec ces différentes méthodes.

Certains chercheurs posent comme postulat que ces estimations du FBC exigent une correction en fonction de la biodisponibilité pour tenir compte de l'adsorption d'une substance chimique par rapport au carbone organique dissous (COD) dans un milieu aquatique, afin que l'estimation corresponde aux résultats des études d'exposition en milieu aquatique [par exemple (13) (14)]. Cette correction n'est toutefois pas forcément appropriée en raison des faibles niveaux de COD requis dans une étude avec exposition en milieu aquatique pour une estimation dans le «pire cas de figure» (à savoir le ratio entre la substance biodisponible et la substance mesurée dans la solution). Avec les substances très hydrophobes, l'absorption par les branchies peut être limitée par le taux de diffusion passive près des ouïes; dans ce cas, il est possible que la correction tienne plus compte de cet effet que de son objet initial.

Il est conseillé de s'intéresser aux méthodes qui nécessitent des données facilement disponibles sur les substances testées dans l'étude avec exposition par voie alimentaire décrite ici (à savoir le log K_{oe}, et le poids des poissons). D'autres méthodes nécessitant des informations plus complexes peuvent s'appliquer, mais impliqueront de procéder à des mesures supplémentaires durant l'essai ou de disposer d'informations détaillées sur la substance d'essai ou sur l'espèce testée difficiles à obtenir. En outre, le choix du modèle peut être influencé par le niveau de validation et le domaine d'applicabilité [voir (11) pour une synthèse et une comparaison des différentes méthodes].

Il convient de garder à l'esprit que l'estimation de k_1 obtenue, et le FBC estimé, n'est pas sûre et peut nécessiter d'appliquer le poids de la preuve au FBA obtenu et aux paramètres relatifs à la substance (taille moléculaire par exemple) pour avoir une vue d'ensemble du potentiel de bioaccumulation d'une substance. L'interprétation et l'utilisation de ces paramètres peuvent varier en fonction du cadre réglementaire.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. et Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 25: 1-14.

(2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. et Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. Aquat. Toxicol. 30: 325-341.

(3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. et Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined in vivo and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

▼M7

(4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. Environ. Toxicol. Chem. 22: 1963-1992.

(5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in Aquatic Toxicology and Environmental Fate, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304-315.

(6) Arnot J.A. et Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343-2355.

(7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

(8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. et Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. Environ. Toxicol. Chem. 20: 1399-1420.

(9) Campfens J. et Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. Environ. Sci. Technol. 31: 577-583.

(10) Arnot J.A. et Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. QSAR Comb. Sci. 22: 337-345.

(11) Crookes M. et Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, UK.

(12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. Environ. Toxicol. Chem. 27: 755-777

(13) Anonymou (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(14) Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in Handbook of property estimation methods for chemicals, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Racton, FL, USA: 189-231.

▼B

C. 14. **POISSON, ESSAI SUR LA CROISSANCE DES JUVÉNILES**

1. **MÉTHODE**

La méthode décrite pour cet essai de toxicité sur la croissance des juvéniles reprend la ligne directrice n° 215 de l'OCDE (2000).

1.1. INTRODUCTION

Cet essai vise à évaluer les effets d'une exposition prolongée à des produits chimiques sur la croissance des poissons au stade juvénile. Il s'appuie sur une méthode mise au point et soumise à des essais tournants (1) (3) dans l'Union européenne, qui a pour objet d'évaluer les effets de substances chimiques sur la croissance de la truite arc-en-ciel (*Oncorynchus mvkiss*) au stade juvénile dans des conditions dynamiques. D'autres espèces de poissons bien étudiées peuvent être utilisées. Par exemple, on possède une certaine expérience des essais de croissance sur le danio (*Danio rerio*) ([1]) (2) (4) (5) et sur le medaka (*Oryzias latipes*) (6) (7) (8).

Voir aussi introduction générale, partie C.

1.2. DÉFINITIONS

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): la plus faible concentration de la substance d'essai à laquelle on observe un effet significatif (à $p < 0,05$) par rapport au témoin. Cependant, toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO doivent exercer un effet nocif égal ou supérieur à celui observé à la CMEO.

Concentration sans effet observé (CSEO): la concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO.

CE_X: dans la méthode décrite pour cet essai, la concentration de la substance d'essai qui provoque une variation de x % du taux de croissance des poissons par rapport aux témoins.

Taux de charge: le poids frais des poissons par unité de volume d'eau.

Densité de peuplement: le nombre de poissons par unité de volume d'eau.

Taux de croissance spécifique de chaque poisson: le taux de croissance d'un individu par rapport à son poids initial.

Taux de croissance spécifique moyen par récipient: le taux de croissance moyen de la population d'un récipient (cuve) à une concentration donnée.

Taux de croissance pseudo-spécifique: le taux de croissance individuel comparé au poids initial moyen de la population du récipient.

([1]) Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, p. 231-236.

▼B

1.3. PRINCIPE DE L'ESSAI

Des juvéniles en phase de croissance exponentielle sont pesés, puis placés dans des enceintes expérimentales où ils sont exposés à une gamme de concentrations sublétales de la substance d'essai dissoute dans l'eau, de préférence dans des conditions dynamiques ou, à défaut, dans des conditions semi-statiques (renouvellement discontinu) adéquates. L'essai dure 28 jours. Les poissons sont nourris quotidiennement. La ration alimentant est déterminée en fonction du poids initial des poissons et peut être recalculée après 14 jours. On pèse à nouveau les poissons à la fin de l'essai. Les effets sur le taux de croissance sont analysés à l'aide d'un modèle de-régression afin d'estimer la concentration qui provoquerait une variation de x % du taux de croissance, soit CE_X (CE_{10}, CE_{20} ou CE_{30} par exemple). Les données peuvent aussi être comparées aux valeurs des témoins pour déterminer la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et, de là, la concentration (maximale) sans effet observé (CSEO).

1.4. INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

Il faudrait disposer des résultats d'un essai de toxicité aigué (voir méthode d'essai C.1) réalisé de préférence sur l'espèce choisie pour le présent essai. Cela implique que la solubilité dans l'eau et la pression de vapeur de la substance d'essai soient connues et que l'on dispose d'une méthode d'analyse fiable pour déterminer la quantité de substance dans les solutions d'essai avec une précision et une limite de détection connues et mentionnées dans le rapport.

Il est utile de connaître la formule structurale, la pureté de la substance, la stabilité dans l'eau et à la lumière, le pK_a, le P_{oe} et les résultats d'un essai de biodégradabilité immédiate (voir méthode d'essai C.4).

1.5. VALIDITÉ DE L'ESSAI

Pour qu'un essai soit valide, les conditions suivantes doivent être remplies:

— la mortalité dans le(s) groupe(s) témoin(s) ne doit pas dépasser 10 % a la fin de l'essai,

— le poids moyen des poissons du (des) groupe(s) témoin(s) doit avoir augmenté suffisamment pour que la variation minimale du taux de croissance qui est jugée significative soit détectable. Un essai tournant (2) a montré que, dans le cas de la truite arc-en-ciel, le poids moyen des poissons dans les groupes témoins doit avoir au moins doublé (soit 50 %) par rapport à leur poids moyen initial sur 28 jours; par exemple, poids initial: 1 g/poisson (= 100 %), poids final après 28 jours: > 1,5 g/poisson (> 150 %),

— la concentration de l'oxygène dissous doit se situer à au moins 60 % de la valeur de saturation en air tout au long de l'essai,

— à aucun moment, durant l'essai, la température de l'eau ne doit varier de plus de ± 1 °C entre les enceintes expérimentales et devrait être maintenue dans un intervalle de 2 °C compris dans la plage spécifiée pour l'espèce testée (voir appendice 1).

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Appareillage**

On utilise du matériel courant de laboratoire et notamment:

a) un pH-mètre et un appareil à mesurer l'oxygène;

▼B

b) un instrument pour mesurer la dureté et l'alcalinité de l'eau;

c) un dispositif adéquat de régulation de la température avec, de préférence, une surveillance en continu;

d) des récipients (cuves) fabriqués en un matériau chimiquement inerte et d'une capacité adaptée à la charge et à la densité de peuplement recommandées (voir point 1.8.5 et appendice 1);

e) une balance suffisamment précise (précision de ± 0,5 %).

1.6.2. **Eau**

Toute eau dans laquelle l'espèce testée présente des taux de survie et de croissance à long terme adéquates peut être utilisée pour l'essai. Sa qualité doit demeurer constante pendant toute la durée de l'essai. Le pH de l'eau sera compris dans un intervalle de 6,5 à 8,5 unités, mais sans varier de plus de ± 0,5 unité (de pH) au cours d'un même essai. Une dureté supérieure à 140 mg/l ($CaC0_3$) est recommandée, Pour s'assurer que l'eau de dilution n'influencera pas indûment le résultat de l'essai (par exemple en complexant la substance d'essai), on prélèvera des échantillons à différents intervalles pour analyse. Il y a lieu de mesurer la teneur en métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, par exemple), en principaux anions et cations (Ca, Mg, Na, K, Cl, $S0_4$, par exemple), en pesticides (total des pesticides organophosphorés et organochlorés, par exemple), en carbone organique total et en solides en suspension. Ces mesures devraient être effectuées tous les trois mois, par exemple, pour une eau de dilution dont on sait que la qualité est relativement constante. Si la qualité de l'eau s'est avérée constante durant au moins un an, on pourra espacer les déterminations (par exemple tous les 6 mois). Certaines caractéristiques chimiques requises pour une eau de dilution acceptable sont énumérées a l'appendice 2.

1.6.3. **Solutions d'essai**

Par dilution d'une solution mère, on prépare des solutions d'essai aux concentrations choisies.

La solution mère devrait, de préférence, être préparée par simple mélange ou agitation de la substance d'essai dans l'eau de dilution par des moyens mécaniques (agitateur ou ultrasons, par exemple). Des colonnes de saturation (colonnes de solubilité) peuvent être utilisées pour amener la solution mère à la concentration souhaitée.

L'emploi de solvants ou de dispersants (agents solubilisants) peut être indiqué dans certains cas pour obtenir une solution mère à la concentration voulue. Les solvants qui conviennent sont, par exemple, l'acétone, l'éthanol, le méthanol, le diméthylsulfoxyde, le dimethylformamide et le triethylèneglycol. Parmi les dispersants adéquats. citons le Cremophor RH40. le Tween 80, la méthylcellulose à 0,01 % et le HCO-40. Il convient d'être vigilant lorsqu'on utilise des agents facilement biodégradables (comme l'acétone) et/ou des composés très volatils car ils peuvent entraîner une prolifération bactérienne dans les essais dynamiques. Lorsqu'on utilise un agent solubilisant, il ne doit pas avoir d'effet significatif sur la croissance des poissons ni d'effets nocifs visibles sur les juvéniles, ce que révélera l'observation d'un témoin ne comprenant que le solvant.

▼B

Les essais dynamiques nécessitent un système qui délivre et dilue en continu une solution mère de la substance d'essai (par exemple, une pompe doseuse, un dilueur proportionnel, un système de saturation), pour distribuer une série de concentrations dans les enceintes d'essai. Les débits des solutions mères et de l'eau de dilution doivent être contrôlés à intervalles quotidiens de préférence, au cours de l'essai, et ne devraient pas varier de plus de 10 % tout au long de celui-ci. Un essai tournant (3) a montré que, pour la truite arc-en-ciel, une fréquence de renouvellement de l'eau au cours de l'essai de 6 litres/g de poisson/jour était acceptable (voir point 1.8.2.2).

S'agissant des essais semi-statiques (essais avec renouvellement), la fréquence de renouvellement du milieu dépendra de la stabilité de la substance d'essai, mais un renouvellement quotidien de l'eau est recommandé. Si des essais de stabilité préliminaires (voir point 1.4) révèlent que la concentration de la substance n'est pas stable (c'est-à-dire qu'elle sort d'un intervalle de 80 à 120 % de la concentration nominale ou qu'elle tombe en dessous de 80 % de la concentration mesurée initialement) au cours de la période de renouvellement, il faudra envisager de pratiquer un essai dynamique.

1.6.4. **Sélection de l'espèce**

La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchas mykiss*) est recommandée dans cet essai car c'est à propos de cette espèce que l'on a acquis la plus grande expérience au cours d'essais tournants (1) (3). D'autres espèces bien étudiées peuvent cependant être utilisées, mais le mode opératoire devra éventuellement être adapté afin d'offrir les conditions adéquates. Par exemple, on dispose également d'une certaine expérience au sujet du danio (*Danio rerio*) (4) (5) et du medaka (*Oryzias latipes*) (6) (7) (8). Dans ce cas, le choix de l'espèce et de la méthode expérimentale doit être justifié.

1.6.5. **Soins des poissons**

Les poissons d'essai seront sélectionnes au sein d'une même population, issue de préférence du même frai, qui aura été gardée pendant au moins deux semaines avant l'essai dans des conditions de qualité de l'eau et d'illumination similaires à celles de l'essai. Ils devraient recevoir une ration alimentaire quotidienne atteignant au moins 2 % de leur poids corporel et de préférence 4 % pendant toute la durée des soins et de l'essai.

Après une période de mise en condition de 48 heures, on mesure la mortalité et on applique les critères suivants:

— mortalité supérieure à 10 % de la population en sept jours: le lot entier est rejeté,

— mortalité comprise entre 5 et 10 % de la population: période d'acclimatation prolongée de sept jours, si la mortalité dépasse 5 % pendant la deuxième période de sept jours, le lot entier est rejeté,

— mortalité inférieure à 5 % de la population en sept jours: le lot est accepté.

Les poissons ne devraient pas recevoir un traitement pour une maladie durant les deux semaines précédant l'essai ou pendant l'essai.

▼B

1.7. CONCEPTION DE L'ESSAI

Par «conception de l'essai», on entend le choix du nombre et de l'espacement des concentrations d'essai, le nombre de récipients par concentration et le nombre de poissons par récipient. Idéalement, l'essai devrait être conçu en fonction de:

a) l'objectif de l'étude:

b) la méthode d'analyse statistique qui sera utilisée;

c) la disponibilité et le coût des ressources expérimentales.

L'énoncé de l'objectif devrait, si possible, spécifier la puissance statistique que requiert une différence donnée (par exemple, dans le taux de croissance) pour être détectée, ou encore la précision avec laquelle la CE, doit être fournie (avec x = 10, 20 ou 30, par exemple et de préférence pas au-dessous de 10) pour être estimée. Faute de quoi il est impossible de donner une indication précise de l'échelle de l'étude.

Il importe de reconnaître qu'une conception qui est optimale (qui tire le meilleur parti des ressources) lorsqu'on utilise une certaine méthode d'analyse statistique ne l'est pas nécessairement avec une autre méthode. La conception recommandée pour l'estimation d'une CMEO/CSEO ne sera donc pas identique à celle recommandée pour une analyse par régression.

Dans la plupart des cas, l'analyse par régression est préférable à l'analyse de la variance, pour des raisons exposées par Stephan et Rogers (9) Cependant, si on ne trouve aucun modèle de régression adéquat ($r^2 < 0,9$), il faut recourir à la CSEO/CMEO.

1.7.1. **Conception pour l'analyse par régression**

Les considérations importantes pour la conception d'un essai à analyser par régression sont les suivantes:

a) La concentration avec effet (par exemple, $CE_{10,\ 20,\ 30}$) et la gamme de concentrations dans laquelle la substance d'essai produit un effet intéressant doivent nécessairement être couvertes par les concentrations incluses dans l'essai. La précision avec laquelle les concentrations produisant un effet peuvent être estimées sera la meilleure lorsque la concentration avec effet se trouve au milieu de la plage des concentrations testées. Un essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur peut s'avérer utile pour sélectionner les concentrations d'essai appropriées.

b) Pour satisfaire les conditions de la modélisation statistique, l'essai doit comporter au moins un récipient témoin et cinq autres à différentes concentrations. Le cas échéant, lorsqu'on utilise un agent solubilisant, il faudrait étudier un groupe témoin contenant l'agent solubilisant à la concentration d'essai la plus élevée en plus des groupes d'essai (voir paragraphes 1.8.3 et 1.8.4).

c) Une série géométrique ou logarithmique appropriée (10) (voir appendice 3) peut être utilisée. Un espacement logarithmique entre les concentrations d'essai est préférable.

▼B

d) Si on dispose de plus de six récipients, les récipients supplémentaires devraient servir de répliques ou être répartis dans la gamme des concentrations de manière à diminuer l'espacement entre les concentrations. Ces deux mesures sont aussi valables l'une que l'autre.

1.7.2. **Conception pour l'estimation de la CSEO/CMEO à l'aide de l'analyse de la variance**

Il serait préférable d'avoir plusieurs récipients répliques pour chaque concentration, et d'effectuer l'analyse statistique au niveau du récipient (11). Sans récipients répliques, il est impossible de prendre en compte la variabilité entre les récipients en plus de celle qui existe d'un poisson à l'autre. L'expérience a cependant montré (12) que la variabilité entre les récipients était très inférieure à celle qui existe au sein de chaque récipient (autrement dit, entre les poissons) dans le cas examiné. C'est pourquoi une alternative relativement acceptable consiste à effectuer l'analyse statistique au niveau de chaque poisson.

On doit normalement utiliser au moins cinq concentrations d'essai selon une série géométrique obéissant à un facteur qui ne dépasse pas de préférence 3.2.

Généralement, lorsque les essais sont conduits dans des récipients répliques, le nombre de récipients témoins répliques, et par conséquent le nombre de poissons, devrait être le double du nombre choisi à chaque concentration d'essai, qui devrait être toujours le même (13) (14) (15). A contrario, sans récipients répliques, le nombre de poissons dans le groupe témoin devrait être le même que dans chaque concentration d'essai.

Si l'analyse de la variance est conduite au niveau des récipients plutôt qu'à celui des poissons [ce qui exigerait un marquage individuel des poissons ou l'utilisation de taux de croissance «pseudo-spécifiques» (voir paragraphe 2.1.2)], il faut un nombre suffisant de récipients répliques pour pouvoir déterminer l'écart-type entre les «récipients de même concentration». Ce qui signifie que l'erreur dans l'analyse de la variance ait au moins 5 degrés de liberté (1l). Si seuls les témoins ont des répliques, la variabilité de l'erreur risque d'être faussée puisqu'elle pourrait s'accroître avec la valeur moyenne du taux de croissance en question. Comme le taux de croissance a des chances de diminuer lorsque la concentration augmente, on aura tendance à surestimer la variabilité.

1.8. MODE OPÉRATOIRE

1.8.1. **Sélection et pesée des poissons d'essai**

Il importe que le poids des poissons varie le moins possible au début de l'essai. On trouvera à l'appendice 1 les gammes de poids qui conviennent aux différentes espèces recommandées pour cet essai. Idéalement, au début de l'essai, la gamme des poids de l'ensemble du lot de poissons utilisés dans l'essai devrait rester comprise dans un intervalle de ± 10 % de la moyenne arithmétique et en aucun cas excéder 25 %. Il est recommandé de peser un sous-échantillon de poissons avant l'essai afin d'estimer le poids moyen.

▼B

Les poissons doivent être privés de nourriture pendant les 24 heures qui précèdent le début de l'essai. Ils sont ensuite choisis au hasard. À l'aide d'un anesthésique général [par exemple, une solution aqueuse de 100 mg/litre de méthanesulphonate de tricaïne (MS 222) neutralisée par l'adjonction de deux parts de bicarbonate de sodium par part de MS 222], les poissons doivent être pesés individuellement en poids frais (*blolted dry*, poissons essuyés) avec la précision indiquée à l'appendice 1. Les poissons dont le poids se situe à l'intérieur de l'intervalle voulu seront retenus puis répartis au hasard entre les récipients d'essai. On notera le poids frais (*wet weighl*) total des poissons dans chaque récipient, l'utilisation d'anesthésique de même que la manipulation des poissons (y compris le séchage et la pesée) peuvent stresser et blesser les jeunes poissons, en particulier les espèces de petite taille. Les juvéniles doivent donc être manipulés avec la plus grande précaution afin d'éviter de stresser et de blesser les animaux testés.

Les poissons sont pesés à nouveau le 28^{e} jour de l'essai (voir point 1.8.6). Si toutefois on juge nécessaire de recalculer la ration alimentaire, on pèsera à nouveau les poissons au 14^{e} jour de l'essai (voir point 1.8.2.3). On pourra recourir à une autre méthode telle que la technique photographique par exemple pour évaluer les variations de taille des poissons à partir de quoi la ration alimentaire pourra être ajustée.

1.8.2. **Conditions d'exposition**

1.8.2.1. *Durée*

La durée de l'essai est de ≥ 28 jours.

1.8.2.2. *Taux de charge et densité de peuplement*

Il importe que le taux de charge et la densité soient adaptés à l'espèce testée (voir appendice 1). Si la densité de peuplement est trop élevée, le stress engendré par la surpopulation entraînera une diminution des taux de croissance, et probablement la maladie. Si elle est trop faible, elle peut induire un comportement territorial susceptible d'affecter également la croissance. En tout état de cause, le taux de charge doit être suffisamment bas pour que la concentration de l'oxygène dissous puisse être maintenue à au moins 60 % de la valeur de saturation en air, sans aération. Un essai tournant (3) a montré que, dans le cas de la truite arc-en-ciel, un taux de charge de 16 truites de 3 à 5 grammes dans un volume de 40 litres était acceptable. La fréquence de renouvellement de l'eau recommandée durant l'essai est de 6 litres/g de poissons par jour.

1.8.2.3. *Alimentation*

Les poissons doivent recevoir une alimentation adéquate (voir appendice 1) en quantité suffisante pour permettre un taux de croissance acceptable. Il faut veiller à éviter la prolifération microbienne et la turbidité de l'eau. Dans le cas de la truite arc-en-ciel, une ration quotidienne de 4 % de son poids corporel par jour devrait remplir ces conditions (3) (16) (17) (18). La ration quotidienne peut être divisée en deux parts égales et administrée aux poissons en deux fois, à au moins 5 heures d'intervalle. La ration est fonction du poids total initial des poissons dans chaque récipient d'essai. Si les poissons sont pesés à nouveau le 14^{e} jour, on recalcule la ration. Les poissons doivent être privés de nourriture pendant les 24 heures qui précèdent leur pesée.

▼B

Les aliments non consommés et les matières fécales doivent être enlevés quotidiennement des récipients d'essai par un nettoyage soigneux du fond de chaque récipient à l'aide d'un suceur.

1.8.2.4. *Lumière et température*

La photopériode et la température de l'eau d'essai doivent être adaptées à l'espèce testée (voir appendice 1).

1.8.3. **Concentrations d'essai**

On doit normalement utiliser cinq concentrations de la substance d'essai, quelle que soit la conception de l'essai (voir point 1.7.2). Une connaissance préalable de la toxicité de la substance d'essai (tirée par exemple d'un essai de toxicité aiguë et/ou d'études de détermination de l'ordre de grandeur) devrait faciliter le choix des concentrations d'essai adéquates. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. La concentration d'essai la plus élevée ne doit pas dépasser la limite de solubilité de la substance dans l'eau.

Si un agent solubilisant est utilisé pour faciliter la préparation de la solution mère, sa concentration finale ne doit pas dépasser 0,1 ml/l et doit, de préférence, être identique dans tous les récipients d'essai (voir point 1.6.3). Le recours à ce genre de produit devrait cependant être évité dans toute la mesure du possible.

1.8.4. **Témoins**

Le nombre de récipients témoins contenant l'eau de dilution dépend de la conception de l'essai (voir points 1.7-1.7.2). Si l'on utilise un agent solubilisant, on inclura le même nombre de témoins pour l'eau de dilution que pour l'agent solubilisant.

1.8.5. **Fréquence des analyses quantitatives et des mesures**

Au cours de l'essai, les concentrations de la substance à tester sont déterminées à intervalles réguliers (voir ci-après).

Dans les essais dynamiques, les débits du diluant et de la solution mère de substance toxique seront vérifiés périodiquement, de préférence chaque jour. Ces débits ne devraient pas varier de plus de 10 % tout au long de l'essai. Lorsque les concentrations de la substance d'essai sont censées ne pas s'écarter de ± 20 % des valeurs nominales (autrement dit rester comprises dans une plage de 80 à 120 %; voir points 1.6.2 et 1.6.3), on recommande d'analyser au moins la concentration la plus basse et la plus élevée au début de l'essai et périodiquement toutes les semaines par la suite. Pour les essais dans lesquels la concentration de la substance d'essai n'est pas censée rester comprise dans un intervalle de ± 20 % des valeurs nominales (d'après les données sur la stabilité de la substance d'essai), il est nécessaire d'analyser toutes les concentrations d'essai, mais selon le même régime.

Dans les essais semi-statiques (avec renouvellement) où la concentration de la substance d'essai est censée rester comprise dans un intervalle de ± 20 % des valeurs nominales, il est recommandé, au minimum, d'analyser la concentration la plus basse et la plus élevée juste après leur préparation et juste avant le renouvellement au début de l'essai et toutes les semaines par la suite. Pour les essais dans lesquels la concentration de la substance d'essai n'est pas censée rester comprise dans un intervalle de ± 20 % des valeurs nominales, il est nécessaire d'analyser toutes les concentrations selon le même régime que pour les substances plus stables.

▼B

On préconise de fonder les résultats sur les concentrations mesurées. Toutefois, si les données disponibles démontrent que la concentration de la substance d'essai en solution a été correctement maintenue, tout au long de l'essai, dans un intervalle de ± 20 % autour de la concentration nominale ou de la concentration mesurée au départ, les résultats peuvent s'appuyer sur les valeurs nominales ou mesurées.

Il peut s'avérer nécessaire de filtrer (par exemple, à l'aide d'un filtre à porcs de 0,45 μm) ou de centrifuger les échantillons. La centrifugation est la procédure recommandée. Toutefois, si le milieu d'essai ne s'absorbe pas sur les filtres, la filtration est également acceptable.

Pendant l'essai, l'oxygène dissous, le pH et la température doivent être mesurés dans tous les récipients d'essai. La dureté totale, l'alcalinité et la salinité, s'il y a lieu, doivent être mesurées dans les récipients témoins et dans celui qui contient la concentration la plus forte. L'oxygène dissous et la salinité, s'il y a lieu, doivent être mesurés au moins trois fois: au début, au milieu et à la fin de l'essai. Dans les essais semi-statiques, on recommande de mesurer l'oxygène dissous plus souvent, de préférence avant et après chaque renouvellement de l'eau ou au moins une fois par semaine. Il faut mesurer le pH au début et à la fin de chaque période de renouvellement de l'eau dans les essais à renouvellement statique et au moins une fois par semaine dans les essais dynamiques. La dureté et l'alcalinité devraient être mesurées une fois au cours de chaque essai. 11 est préférable de surveiller la température en continu dans au moins un récipient d'essai.

1.8.6. **Observations**

Poids: à la fin de l'essai tous les poissons survivants seront pesés en poids frais (poissons essuyés, *blotted dry*) soit en groupes par récipient d'essai soit individuellement. Il est préférable de peser les animaux par récipient d'essai plutôt qu'individuellement, cette dernière méthode obligeant à marquer chaque poisson. Si l'on mesure le taux de croissance spécifique de chaque poisson (pesée individuelle), la technique de marquage devra être choisie de façon à perturber le moins possible les animaux [on peut utiliser une technique différente du cryo-marquage (par congélation), par exemple un mince fil de pêche coloré].

Il faut examiner quotidiennement les poissons durant l'essai et relever toutes les anomalies externes éventuelles (hémorragie, décoloration, par exemple) et les comportement anormaux. Les décès doivent être comptés et les poissons morts retirés du récipient dès que possible. Les poissons morts ne seront pas remplacés, le taux de charge et la densité de peuplement étant suffisamment élevés pour éviter que la modification du nombre de poissons ait des effets sur la croissance. Cependant, la ration alimentaire devra être ajustée.

2. **RÉSULTATS ET RAPPORT**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Il est recommandé qu'un statisticien participe à la fois à la conception et à l'analyse de l'essai, car cette méthode autorise des variations considérables dans la procédure expérimentale, par exemple en ce qui concerne le nombre d'enceintes expérimentales, de concentrations d'essai, de poissons etc. Compte tenu des choix possibles dans la conception de l'essai, aucune orientation ou méthode statistique précise n'est proposée ici.

▼B

Il n'y a pas lieu de calculer les taux de croissance dans les récipients d'essai où la mortalité dépasse 10 %. Le taux de mortalité doit cependant être spécifié pour toutes les concentrations d'essai.

Quelle que soit la méthode utilisée pour analyser les données, le concept central est le taux de croissance spécifique r entre l'instant t_1 et l'instant t_2. Il peut être défini de diverses manières selon que les poissons ont été ou non marqués individuellement ou selon que l'on recherche une moyenne par récipient.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

où:

r_1 = taux de croissance spécifique de chaque poisson

r_2 = taux de croissance spécifique moyen par récipient

r_3 = taux de croissance «pseudo»-spécifique

w_1, w_2 = poids d'un poisson donné aux instants t_1 et t_2, respectivement

$\log_e w_1$ = logarithme du poids d'un poisson donné au début de la période d'étude

$\log_e w_2$ = logarithme du poids d'un poisson donné à la fin de la période d'étude

$\log_e W_1$ = moyenne des logarithmes des valeurs w_1 des poissons du récipient à la fin de la période d'étude

$\log_e W_2$ = moyenne des logarithmes des valeurs w_2 des poissons du récipient à la fin de la période d'étude

t_1, t_2 = moments (jours) du début et de la fin de la période d'étude

r_1, r_2, r_3 peuvent être calculés pour la période comprise entre le jour 0 et le jour 28 et, s'il y a lieu (c'est-à-dire lorsqu'une mesure a été effectuée au 14^e jour), pour les périodes entre 0 et 14 jours et 14 et 28 jours.

2.1.1. **Analyse des résultats par régression (modélisation concentration-effet)**

Cette méthode d'analyse établit une relation mathématique adéquate entre le taux de croissance spécifique et la concentration, ce qui permet d'estimer la «CE_X» c'est-à-dire toute valeur de CE requise. Si l'on utilise cette méthode, il est inutile de calculer r pour chaque poisson (r_1) et l'analyse peut alors s'appuyer sur la valeur moyenne de r pour le récipient (r_2). Cette dernière méthode est préférable. En outre, elle se prête mieux à l'utilisation d'espèces plus petites.

Pour étudier la relation concentration-effet, on porte sur un graphique les taux de croissance spécifiques moyens par récipient (r_2) en fonction de la concentration.

▼B

Pour exprimer la relation entre r_2 et la concentration, il convient de choisir un modèle adéquat et d'étayer ce choix par un raisonnement pertinent.

Si le nombre de poissons survivants varie suivant le récipient, le processus d'ajustement du modèle, qu'il soit simple ou non linéaire, doit être pondéré pour tenir compte de la taille inégale des groupes.

La méthode d'ajustement du modèle doit permettre d'estimer, par exemple, la CE_{20} et de déduire sa dispersion (écart-type ou intervalle de confiance). Le graphique du modèle ajusté devrait être montré en regard des données pour permettre d'apprécier l'adéquation de l'ajustement du modèle (9) (19) (20) (21).

2.1.2. **Analyse des résultats pour l'estimation de la CMEO**

Si le test porte sur plusieurs récipients d'essai répliques (identiques) pour toutes les concentrations, l'estimation de la CMEO pourrait s'appuyer sur une analyse de la variance du taux de croissance spécifique moyen de chaque récipient (voir point 2.1), suivie de l'utilisation d'une méthode pertinente [par exemple, un test de Dunnett ou de Williams (13) (14) (15) (22)] consistant à comparer la moyenne r à chaque concentration avec la moyenne r des témoins afin d'identifier la concentration minimale à laquelle cette différence est significative avec un seuil de probabilité de 0,05. Si les hypothèses requises concernant les méthodes paramétriques ne sont pas remplies — distribution non normale (par exemple, test de Shapiro-Wilk) ou variance hétérogène (test de Bartlett) — il faudra envisager de transformer les données pour homogénéiser les variances avant de mener l'analyse de la variance ou de réaliser une analyse pondérée de la variance.

Si l'essai ne porte pas sur plusieurs récipients par concentration, l'analyse de la variance fondée sur les récipients sera insensible ou impossible. Dans ces circonstances, on peut parvenir à un compromis acceptable en fondant l'analyse de la variance sur le taux de croissance «pseudo» spécifique r_3 de chaque poisson.

La moyenne r_3 pour chaque concentration d'essai peut ensuite être comparée à la moyenne r_3 des témoins. Et la CMEO peut alors être déterminée comme précédemment. Il faut admettre que cette méthode ne tient absolument pas compte de la variabilité entre les récipients, en dehors de celle imputable à la variabilité entre les poissons, et n'offre aucune protection à cet égard. L'expérience a cependant montre (9) que la variabilité entre les récipients était très faible par rapport à celle qui existe dans les récipients (c'est-à-dire entre les poissons). Si l'analyse n'englobe pas les données concernant chaque poisson, il convient d'indiquer la méthode d'identification des valeurs aberrantes (erronées) et de justifier son emploi.

2.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats doivent être interprétés avec prudence lorsque les concentrations mesurées des produits toxiques dans les solutions d'essai sont proches des limites de détection de la méthode d'analyse ou, dans les essais semi-statiques, lorsque la concentration de la substance d'essai diminue entre le moment où la solution vient d'être préparée et le moment qui précède le renouvellement.

2.3. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit fournir les informations suivantes:

▼B

2.3.1. **Substance d'essai**

— État physique et propriétés physico-chimiques pertinentes,

— données relatives à l'identification chimique, notamment la pureté et la méthode d'analyse quantitative de la substance d'essai, s'il y a lieu.

2.3.2. **Espèce testée**

— Nom scientifique,

— souche éventuelle, taille, fournisseur, traitement préalable éventuel, etc.

2.3.3. **Conditions d'essai**

— Méthode utilisée (par exemple, semi-statique/avec renouvellement, dynamique, charge, densité de peuplement, etc.),

— conception de l'essai (par exemple, nombre d'enceintes expérimentales, de concentrations d'essai et de répliques, nombre de poissons par récipient),

— méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (le solubilisant et sa concentration doivent être indiqués, le cas échéant),

— concentrations d'essai nominales, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types dans les récipients d'essai, méthode de détermination et données montrant que les mesures se réfèrent aux concentrations de la substance d'essai en solution vraie,

— caractéristiques de l'eau de dilution: pH. dureté, alcalinité, température, concentration de l'oxygène dissous, teneurs résiduelles en chlore (si mesurées), carbone organique total, solides en suspension, salinité du milieu d'essai (si mesurée) et toute autre mesure effectuée,

— qualité de l'eau dans les récipients d'essai: pH, dureté, température et concentration de l'oxygène dissous,

— informations détaillées sur l'alimentation, [par exemple, le type d'aliment{s), la source, la quantité donnée et la fréquence].

2.3.4. **Résultats**

— Données montrant que les témoins remplissent les critères de validité relatifs à la survie, et données sur la mortalité à toutes les concentrations d'essai,

— techniques d'analyse statistique appliquées, statistiques fondées sur les répliques ou les poissons, traitement des données et justification des méthodes utilisées,

— tableaux donnant les poids individuels et moyens des poissons aux jours 0, 14 (si mesurés) et 28, valeurs des moyennes par récipient ou taux de croissance pseudo-spécifiques (s'il y a lieu) pour les périodes de 0 à 28 jours, ou éventuellement de 0 à 14 et de 14 à 28 jours,

— résultats de l'analyse statistique (analyse par régression ou analyse de la variance) fournis de préférence sous forme de tableau ou de graphique, CMEO ($p = 0,05$) et CSEO ou CE_X avec leurs écarts-types si possible,

▼B

— incidence de toute réaction inhabituelle des poissons et de tout effet visible produit par la substance d'essai.

3. BIBLIOGRAPHIE

(1) Solbe J.F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.

(2) Ashley S., Mallett M.J. and Grandy N.J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

(3) Crossland N.O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, pp 1855-1870.

(4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P.D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B.B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (Brachydanio rerio): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, pp 157-164.

(5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

(6) Holcombe, G.W., Benoit D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. and Johnson, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (Oryzias latipes).Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28, pp 287-297.

(7) Benoit, D.A., Holcombe, G.W. and Spehar, R.L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (Oryzias latipes). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minesota.

(8) Stephan C.E. and Rogers J.W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R C Bahner and D J Hansen, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp 328-338.

(9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 p.

(10) Cox D.R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

(11) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.

(12) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp 1096-1121.

(13) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp 482-491.

▼B

(14) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp 103-117.

(15) Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville N.T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food t o determine food intake by individual rainbow trout, Oncorhynchus mykiss: effect of feeding level. Aquaculture 120, 123-133.

(16) Quinton, J. C. and Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Journal of Fish Biology, 37, 33-41.

(17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 P.

(18) Bruce, R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1485-1494.

(19) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. and McIntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo alto, CA.

(20) Norbert-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.

(21) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pp 510-531.

▼B

Appendice 1

ESPÈCES DE POISSONS RECOMMANDÉES POUR L'ESSAI ET CONDITIONS D'ESSAI APPROPRIÉES

Espèce	Gamme de températures recommandée (°C)	Photopériode (heures)	Gamme recommandée pour le poids initial des poissons (g)	Précision requise de la mesure	Taux de charge (g/l)	Densité de peuplement (par litre)	Alimentation	Durée de l'essai (jours)
Espèce recommandée:								
Oncorhynchus mykiss Truite arc-en-ciel	12,5-16,0	12-16	1-5	à 100 mg près	1,2-2,0	4	Spécialité alimentaire sèche pour frai de salmonidé	≥ 28
Autres espèces bien étudiées:								
Danio rerio Danio	21-25	12-16	0,050-0,100	à 1 mg près	0,2-1,0	5-10	nourriture vivante *(Brachionus Artemia)*	≥ 28
Oryzias latipes Medaka	21-25	12-16	0,050-0,100	à 1 mg près	0,2-1,0	5-20	nourriture vivante *(Brachionus Artemia)*	≥ 28

▼B

Appendice 2

QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ACCEPTABLE

Substance	Concentrations
Matières particulaires (particules)	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	< 50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

▼B

Appendice 3

Série logarithmique de concentrations convenant à un essai de toxicité (9)

Colonne (nombre de concentrations entre 100 et 10, ou entre 10 et 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Une série de cinq concentrations successives (ou plus) peut être choisie dans une colonne. Les points intermédiaires entre les concentrations d'une colonne (x) se trouvent dans la colonne (2x + 1). Les valeurs énumérées peuvent représenter des concentrations exprimées sous forme de pourcentage en volume ou en poids (mg/l ou µg/l). Les valeurs peuvent être multipliées ou divisées par la puissance de 10, adéquate. On pourra utiliser la première colonne si le degré de toxicité est très incertain.

▼B

C.15. POISSON, ESSAI DE TOXICITÉ À COURT TERME AUX STADES DE L'EMBRYON ET DE L'ALEVIN

1. MÉTHODE

La méthode décrite pour cet essai de toxicité à court terme reprend la ligne directrice n° 212 de l'OCDE (1998).

1.1. INTRODUCTION

Cet essai de toxicité à court terme chez le poisson aux stades de l'embryon et de l'alevin consiste à exposer l'animal depuis le stade de l'œuf qui vient d'être fécondé jusqu'à la fin du stade de l'alevin. Aucune alimentation n'est fournie durant l'essai sur les embryons et les alevins, et l'essai devrait donc prendre fin alors que les alevins se nourrissent encore grâce à leur sac vitellin.

Cet essai vise à déterminer les effets létaux et, dans une moindre mesure, sublétaux de produits chimiques à des stades définis de la vie des espèces testées. Il devrait fournir des informations utiles en ce sens qu'il pourrait a) permettre de faire le lien entre les essais létaux et sublétaux, b) servir d'essai de sélection en vue soit d'un essai (complet) de toxicité aux premiers stades de la vie, soit d'un essai de toxicité chronique, et c) être utilisé pour tester des espèces pour lesquelles les techniques d'élevage ne sont pas suffisamment au point pour couvrir la période de transition entre alimentation endogène et alimentation exogène. Il faut savoir que seuls les essais couvrant tous les stades de la vie du poisson sont généralement susceptibles de donner une estimation précise de la toxicité chronique de produits chimiques pour les poissons et que toute limitation de l'exposition écartant tel ou tel stade de la vie risque de diminuer la sensibilité et donc de donner lieu à une sous-estimation de la toxicité chronique. L'essai aux stades de l'embryon et de l'alevin devrait donc être moins sensible que l'essai (complet) de toxicité aux premiers stades de la vie, notamment en ce qui concerne les produits chimiques fortement lipophiles (log P_{oe} > 4) et les substances possédant un mode d'action toxique particulier. On s'attend toutefois à ce que la différence de sensibilité entre les deux essais soit moindre pour les produits chimiques à mode d'action narcotique non spécifique (1).

Avant la publication du présent essai, l'essai aux stades de l'embryon et de l'alevin a surtout été réalisé sur le poisson d'eau douce *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (téléostéens, cyprinidés — nom commun: danio). C'est la raison pour laquelle l'appendice 1 donne des indications détaillées pour la réalisation de l'essai sur cette espèce. Cela n'exclut pas pour autant l'utilisation d'autres espèces de poissons pour lesquelles on dispose déjà d'une certaine expérience (tableaux A et B).

1.2. DÉFINITIONS

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): concentration la plus basse d'une substance d'essai à laquelle on observe un effet significatif (à $p \leq 0,05$) par rapport au témoin. Cependant, toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO doivent exercer un effet nocif supérieur ou égal à celui observé à la CMEO.

Concentration (maximale) sans effet observé (CSEO): concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO.

▼B

1.3. PRINCIPE DE L'ESSAI

Les poissons aux stades de l'embryon et de l'alevin sont exposés à une gamme de concentrations de la substance d'essai dissoute dans l'eau. Le protocole permet de choisir entre un essai semi-statique ou dynamique. Le choix dépend de la nature de la substance d'essai. L'essai débute au moment où l'on place les œufs fécondés dans les enceintes expérimentales et prend fin juste avant que le sac vitellin d'une quelconque larve d'une quelconque enceinte expérimentale ait été complètement absorbé ou avant que des poissons témoins ne meurent d'inanition. Les effets létaux et sublétaux sont évalués et comparés aux valeurs des témoins, en vue de déterminer la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et, de là. la concentration (maximale) sans effet observé (CSEO). Une autre possibilité consiste à analyser ces effets à l'aide d'un modèle de régression permettant d'estimer la concentration qui provoquerait un certain pourcentage d'effet (CL/CE_x) où x représente un pourcentage d'effet défini).

1.4. INFORMATIONS CONCERNANT LA SUBSTANCE D'ESSAI

Il faudrait disposer des résultats d'un essai de toxicité aiguë réalisé de préférence sur l'espèce choisie pour le présent essai. Ces résultats pourront s'avérer utiles pour sélectionner une plage de concentrations appropriée pour l'essai aux premiers stades de la vie. La solubilité dans l'eau (y compris la solubilité dans l'eau de l'essai) et la pression de vapeur de la substance d'essai doivent être connues. Pour déterminer la concentration de la substance dans les solutions d'essai, il convient d'appliquer une méthode d'analyse fiable, dont la précision et la limite de détection sont connues et mentionnées dans le rapport.

Les informations sur la substance d'essai qui peuvent être utiles pour établir les conditions de l'essai comprennent la formule structurale, la pureté de la substance, la stabilité à la lumière, la stabilité dans les conditions de l'essai, le pKa, le coefficient de partage n-octanol/eau (P_{oe}) et les résultats d'un essai de biodégradabilité immédiate (voir méthode C.4).

1.5. VALIDITÉ DE L'ESSAI

La validité de l'essai repose sur les conditions suivantes:

— le taux global de survie des œufs fécondés dans les groupes témoins et, s'il y a lieu, dans les récipients ne contenant que le solvant, doit être supérieur ou égal aux limites définies dans les appendices 2 et 3,

— la concentration de l'oxygène dissous doit se situer entre 60 et 100 % de la valeur de saturation en air tout au long de l'essai,

— à aucun moment au cours de l'essai, la température de l'eau ne doit varier de plus de ± 1,5 °C entre les différentes enceintes expérimentales ou entre deux jours consécutifs, et devrait être maintenue dans la plage spécifiée pour l'espèce testée (appendices 2 et 3).

▼B

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Enceintes d'essai**

N'importe quel récipient en verre ou fabriqué dans un matériau chimiquement inerte peut être utilisé. Les récipients doivent être suffisamment grands pour répondre aux critères de charge (voir point 1.7.1.2). Il est recommandé de placer les enceintes expérimentales au hasard dans la partie du laboratoire où se déroule l'essai. Il est souhaitable de disposer les enceintes expérimentales selon un schéma randomisé par blocs, chaque traitement étant représenté dans chaque bloc, plutôt que de les placer de façon complètement aléatoire, lorsqu'il existe des effets systématiques dans le laboratoire qui peuvent être contrecarrés par la randomisation par blocs. Si celle-ci est utilisée, elle doit être prise en compte dans l'analyse ultérieure des résultats. Les enceintes expérimentales doivent être protégées de toute perturbation indésirable.

1.6.2. **Sélection des espèces de poissons**

Les espèces de poissons recommandées sont énumérées dans le tableau 1A. Cela n'exclut pas l'utilisation d'autres espèces (des exemples figurent dans le tableau 1B), mais le mode opératoire devra éventuellement être adapté afin d'offrir les conditions adéquates. Dans ce cas, les choix de l'espèce et de la méthode expérimentale doivent être justifiés.

1.6.3. **Soin des poissons géniteurs**

La ligne directrice 210 de l'OCDE ([1]) et les références (2) (3) (4) (5) (6) donnent des indications détaillées sur la façon de maintenir les poissons géniteurs dans des conditions satisfaisantes.

1.6.4. **Manipulation des embryons et des larves**

Les embryons et les larves peuvent être exposés, au sein de la cuve principale, dans des récipients plus petits pourvus de côtés ou d'extrémités en filet, permettant le passage de la solution d'essai. Il est possible d'induire un écoulement non turbulent dans ces petits récipients en les suspendant à un bras qui déplace le récipient verticalement, en gardant toujours les organismes submergés; un système de siphon peut aussi être employé. Les œufs fécondés des salmonidés peuvent être posés sur des supports ou des grilles ayant des ouvertures suffisantes pour permettre aux larves de passer au travers après l'éclosion. Les pipettes Pasteur conviennent au prélèvement des embryons et des larves dans les essais semi-statiques où le milieu est entièrement renouvelé chaque jour (voir point 1.6.6).

Quand on utilise des récipients, des grilles ou des filets pour maintenir les œufs à l'intérieur de la cuve d'essai principale, ces dispositifs doivent être enlevés après l'éclosion des larves ([1]), mais il faut conserver des filets pour empêcher les poissons de s'échapper. Si les larves doivent être transférées, il ne faut pas les exposer à l'air ni utiliser de filets pour enlever les poissons des récipients contenant les œufs (ces précautions sont superflues pour des espèces moins fragiles, comme la carpe). Le moment de ce transfert varie avec l'espèce et il n'est pas toujours nécessaire. Dans les essais semi-statiques, des béchers ou des récipients peu profonds peuvent être utilisés, munis, si nécessaire, d'une grille placée un peu au-dessus du fond du récipient. Si le volume de ces récipients est suffisant pour satisfaire aux critères de charge (voir point 1.7.1.2), il n'est pas nécessaire de transférer les embryons ou les larves.

([1]) OCDE. Paris, 1992, ligne directrice 210, «Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie».

▼B

1.6.5. **Eau**

Toute eau répondant aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable (énumérées à l'appendice 4) et dans laquelle les témoins de l'espèce testée ont un taux de survie au moins aussi satisfaisant que celui décrit dans les appendices 2 et 3 peut être utilisée pour l'essai. La qualité de cette eau devrait rester constante pendant toute la durée de l'essai. La variation du pH devrait rester comprise dans un intervalle de ± 0,5 unités. Pour s'assurer que l'eau de dilution n'influencera pas indûment les résultats de l'essai (par exemple en complexant la substance d'essai) ou ne nuira pas au comportement des poissons géniteurs, des échantillons doivent être prélevés périodiquement en vue d'être analysés. Il y a lieu de mesurer la teneur en métaux lourds (par exemple, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd et Ni), en principaux anions et cations (par exemple, Ca, Mg, Na, K, Cl et SO_4), en pesticides (par exemple, la totalité des organophosphorés et la totalité des organochlorés), en carbone organique total et en solides en suspension. Ces mesures devraient être effectuées tous les trois mois, par exemple, lorsqu'on sait que l'eau de dilution présente une qualité relativement constante. Si la qualité de l'eau s'est avérée constante sur une période d'au moins un an, les déterminations pourront être plus espacées (par exemple, tous les six mois).

1.6.6. **Solutions d'essai**

Par dilution d'une solution mère, on prépare des solutions d'essai aux concentrations choisies.

La solution mère devrait, de préférence, être préparée par simple mélange ou agitation mécanique de la substance d'essai dans l'eau de dilution (par exemple, au moyen d'un agitateur ou par ultrasons). Des colonnes de saturation (colonnes de solubilité) peuvent être utilisées pour amener la solution mère à la concentration souhaitée. Le recours à des solvants ou dispersants (agents solubilisants) doit être évité dans toute la mesure du possible; il peut toutefois s'avérer nécessaire d'utiliser ces produits pour obtenir une solution mère à la concentration voulue. Les solvants qui conviennent sont, par exemple, l'acétone, l'éthanol, le méthanol, le diméthyl-formamide et le triéthylèneglycol. Parmi les dispersants adéquats, citons le Cremophor RH40, le Tween 80, la méthylcellulose à 0,01 % et le HCO-40. Il convient d'être vigilant lorsque l'on utilise des agents facilement biodégradables (par exemple, l'acétone) et/ou volatils, car ils peuvent entraîner une prolifération bactérienne dans les essais dynamiques. L'agent solubilisant, le cas échéant, ne doit pas exercer d'effet significatif sur la survie ni nuire de façon visible aux premiers stades de la vie. d'après l'observation d'un témoin ne comportant que le solvant. Cependant, l'usage de ces substances doit être évité dans toute la mesure du possible.

S'agissant des essais semi-statiques, deux méthodes de renouvellement peuvent être adoptées: soit i) les nouvelles solutions d'essai sont préparées dans des récipients propres et l'on transvase avec précaution les œufs et les larves survivants dans les nouveaux récipients avec un petit volume de solution ancienne, en évitant de les exposer à l'air, soit ii) les organismes testés sont laissés dans leur récipient d'essai pendant que l'on renouvelle au moins les trois-quarts de leur eau. La fréquence de renouvellement du milieu dépend de la stabilité de la substance d'essai, mais un renouvellement quotidien de l'eau est recommandé. Si les tests préliminaires de stabilité (voir point 1.4) révèlent que la concentration de la substance n'est pas stable (sort de l'intervalle de 80 à 120 % de la concentration nominale ou tombe en dessous de 80 % de la concentration mesurée initialement) au cours de la période de renouvellement, il faudrait envisager de pratiquer un essai dynamique. Quoi qu'il en soit, il convient d'éviter de stresser les larves durant le renouvellement de l'eau.

▼B

Les essais dynamiques nécessitent un système qui délivre et dilue en continu la solution mère de la substance d'essai (par exemple, une pompe doseuse, un dilueur proportionnel, un système de saturation), pour distribuer une série de concentrations vers les enceintes d'essai. Les débits des solutions mères et de l'eau de dilution doivent être contrôlés à intervalles quotidiens de préférence, et ne devraient pas varier de plus de 10 % tout au long de l'essai. Un débit équivalent à au moins cinq volumes d'enceintes expérimentales par 24 heures s'est avéré adéquat (2).

1.7. MODE OPÉRATOIRE

Des informations utiles concernant la marche à suivre pour les essais de toxicité sur les embryons de poisson et les alevins se trouvent dans les publications; la bibliographie de ce texte en donne quelques références (7) (8) (9).

1.7.1. **Conditions d'exposition**

1.7.1.1. *Durée*

L'essai devrait débuter de préférence dans les 30 minutes qui suivent la fécondation des œufs. Les embryons sont immergés dans la solution d'essai avant, ou aussitôt que possible après, le commencement de la phase de segmentation du blastodisque et, dans tous les cas. avant le début du stade de la gastrula. Quand les œufs proviennent d'un fournisseur commercial, il n'est pas toujours possible de débuter l'essai juste après la fécondation. Comme la sensibilité de l'essai peut être fortement influencée par un retard dans son lancement, l'essai devrait débuter dans les 8 heures qui suivent la fécondation. Les larves n'étant pas nourries durant la période d'exposition, l'essai doit s'achever juste avant que le sac vitellin d'une quelconque larve d'une quelconque enceinte expérimentale soit complètement absorbé ou avant que les témoins ne meurent d'inanition. La durée de l'essai dépend de l'espèce utilisée. Certaines durées sont recommandées aux appendices 2 et 3.

1.7.1.2. *Charge*

Le nombre d'œufs fécondés au début de l'essai doit être suffisant pour répondre aux critères statistiques. Il y a lieu de les répartir au hasard entre les différents traitements et d'utiliser au moins 30 œufs fécondés répartis en nombre égal (ou aussi proche de l'égalité que possible, car il peut être difficile d'obtenir des lots identiques avec certaines espèces) entre au moins trois enceintes d'essai identiques pour chaque concentration. Le taux de charge (biomasse par volume de solution d'essai) doit être suffisamment bas pour qu'une concentration d'oxygène dissous d'au moins 60 % de la valeur de saturation en air puisse être maintenue sans aération. Dans le cas des essais dynamiques, un taux de charge n'excédant pas 0,5 g/l par 24 heures et ne dépassant pas 5 g/l de solution, à tout moment, a été recommandé (2).

1.7.1.3. *Lumière et température*

La photopériode et la température de l'eau d'essai doivent être adaptées à l'espèce testée (voir appendices 2 et 3). En vue de surveiller la température, il peut être approprié d'utiliser un récipient d'essai supplémentaire.

▼B

1.7.2. **Concentrations d'essai**

On doit normalement utiliser cinq concentrations de la substance d'essai espacées par un facteur constant ne dépassant pas 3,2. La courbe de la CL_{50} en fonction de la période d'exposition, obtenue au cours de l'étude de toxicité aiguë, doit être prise en considération lors de la sélection de la plage des concentrations d'essai. Il peut être judicieux, dans certaines circonstances, d'utiliser moins de cinq concentrations, par exemple, dans les essais limites, et un intervalle plus faible entre les concentrations. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. Il n'est pas nécessaire de tester les concentrations supérieures à la CL_{50} après 96 heures ou supérieures à 100 mg/l lorsque la CL_{50} est supérieure à cette concentration. Les substances ne devraient pas être testées au-delà de leur limite de solubilité dans l'eau d'essai.

Lorsqu'un agent solubilisant est utilisé pour faciliter la préparation des solutions d'essai (voir point 1.6.6), sa concentration finale dans les récipients d'essai ne doit pas dépasser 0,1 ml/1 et doit être identique dans tous les récipients d'essai.

1.7.3. **Témoins**

Un témoin contenant l'eau de dilution (en autant d'exemplaires que de besoin) et, le cas échéant, un témoin contenant l'agent solubilisant (en autant d'exemplaires que de besoin) doivent être étudiés parallèlement aux séries traitées avec la substance.

1.7.4. **Fréquence des analyses quantitatives et des mesures**

Au cours de l'essai, les concentrations de la substance à tester sont déterminées à intervalles réguliers.

Dans les essais semi-statiques où la concentration de la substance d'essai est censée rester comprise dans un intervalle de ± 20 % autour de la concentration nominale (dans une plage de 80 à 120 %, voir points 1.4 et 1.6.6), il est recommandé, au minimum, d'analyser la concentration la plus basse et la plus élevée, dès leur préparation et juste avant le renouvellement du milieu, à au moins trois occasions régulièrement espacées au cours de l'essai (les analyses devraient être pratiquées sur des échantillons prélevés dans la même solution, dès leur préparation et au moment du renouvellement).

Pour les essais dans lesquels la concentration de la substance d'essai n'est pas censée rester comprise dans un intervalle de ± 20 % autour de la concentration nominale (d'après les résultats concernant la stabilité de la substance), ii est nécessaire d'analyser toutes les concentrations, dès leur préparation et au moment du renouvellement, mais selon le même régime, c'est-à-dire à au moins trois occasions, régulièrement espacées au cours de l'essai. La détermination des concentrations de la substance d'essai avant le renouvellement ne doit être réalisée que sur un seul récipient par concentration. Les déterminations ne devraient pas être espacées de plus de sept jours. On préconise de baser les résultats sur les concentrations mesurées. Toutefois, si les données disponibles montrent que la concentration de la substance d'essai dans la solution s'est maintenue correctement dans un intervalle de ± 20 % autour de la concentration nominale ou mesurée au départ, tout au long de l'essai, les résultats peuvent s'appuyer sur la concentration nominale ou les valeurs mesurées au départ.

Dans le cas des essais dynamiques, il convient d'appliquer un régime de prélèvement des échantillons similaire à celui décrit pour les essais semi-statiques (mais le dosage des solutions juste avant leur renouvellement ne s'applique pas ici). Néanmoins, si l'essai dure plus de sept jours, il peut être souhaitable d'augmenter le nombre de prélèvements au cours de la première semaine (par exemple, trois séries de mesures), afin de s'assurer que les concentrations d'essai restent stables.

▼B

Il peut, dans certains cas, s'avérer nécessaire de filtrer (par exemple, à l'aide d'un filtre à pores de 0,45 µm de diamètre) ou de centrifuger les échantillons. Toutefois, comme la centrifugation ou la filtration ne permettent pas toujours de séparer la fraction non biodisponible de la substance d'essai de sa fraction biodisponible, il peut être inutile de soumettre les échantillons à ces traitements.

Pendant l'essai, l'oxygène dissous, le pH et la température doivent être mesurés dans tous les récipients d'essai. La dureté totale et la salinité, le cas échéant, doivent être déterminées dans les témoins et dans un des récipients contenant la concentration la plus élevée. L'oxygène dissous et la salinité, le cas échéant, doivent être mesurés au moins trois fois: au début, au milieu et à la fin de l'essai. Dans les essais semi-statiques, il est recommandé de mesurer l'oxygène dissous plus fréquemment, de préférence avant et après chaque renouvellement de l'eau ou au moins une fois par semaine. Le pH devrait être mesuré au début et à la fin de chaque période de renouvellement de l'eau dans les essais semi-statiques et au moins une fois par semaine dans les essais dynamiques. Il faudrait déterminer la dureté une fois dans chaque essai. La température devrait être mesurée quotidiennement et, de préférence, surveillée en continu dans au moins un récipient d'essai.

1.7.5. **Observations**

1.7.5.1. *Stade de développement embryonnaire*

Le stade embryonnaire (stade de la gastrula) au début de l'exposition à la substance d'essai doit être vérifié aussi précisément que possible. Cela peut se faire sur un échantillon représentatif d'œufs bien conservés et rendus translucides. Des descriptions et des illustrations des stades embryonnaires peuvent être consultées dans les publications (2) (5) (10) (11).

1.7.5.2. *Éclosion et survie*

Il faut observer et dénombrer les éclosions et les survivants au moins une fois par jour. Il peut être souhaitable d'effectuer des observations plus fréquentes au début de l'essai (par exemple, toutes les 30 minutes au cours des trois premières heures), puisque dans certains cas, les temps de survie peuvent être plus significatifs que le seul nombre de morts (notamment en cas d'effets toxiques aigus). Les larves et les embryons morts doivent être retirés dès qu'ils sont repérés, car ils peuvent se décomposer rapidement. Il convient d'être extrêmement attentif, lorsque l'on retire les individus morts, à ne pas heurter ou léser physiquement les œufs et les larves adjacents, qui sont très délicats et sensibles. Les critères indiquant la mort varient en fonction du stade de développement:

— **pour les œufs**: en particulier au début de leur cycle, une diminution marquée de la transparence et un changement de coloration, dus à la coagulation et/ou à la précipitation de protéines et conduisant à un aspect blanc opaque,

— **pour les embryons**: absence de mouvement corporel et/ou absence de battement du cœur et/ou décoloration opaque chez les espèces dont les embryons sont normalement transparents,

— **pour les larves**: immobilité et/ou absence de mouvement respiratoire et/ou absence de battement du cœur et/ou coloration blanche opaque du système nerveux central et/ou absence de réaction aux stimuli mécaniques.

▼B

1.7.5.3. *Aspect anormal*

On doit noter le nombre de larves présentant une anomalie corporelle et/ou de la pigmentation, ainsi que le stade de résorption du sac vitellin, à des intervalles de temps adéquats, en fonction de la durée de l'essai et de la nature de l'anomalie décrite. Il faut savoir que des larves et des embryons anormaux surviennent de façon naturelle et que leur proportion peut atteindre quelques pour cent chez le ou les témoins de certaines espèces. Les animaux anormaux ne doivent être retirés des récipients d'essai qu'à leur mort.

1.7.5.4. *Comportement anormal*

Des anomalies telles qu'une hyperventilation, une nage mal coordonnée et une immobilité atypique doivent être notées à des intervalles de temps qui dépendent de la durée de l'essai. Ces effets, bien que difficiles à quantifier, peuvent le cas échéant contribuer à l'interprétation des données de mortalité, en fournissant des informations sur le mode d'action toxique de la substance.

1.7.5.5. *Longueur*

À la fin de l'essai, il est recommandé de mesurer la longueur de chaque individu en utilisant la longueur standard, la longueur à la fourche ou la longueur totale. Cependant, si l'on constate une putréfaction de la nageoire caudale ou une usure des nageoires, on doit employer la longueur standard. Habituellement, dans un essai correctement exécuté, le coefficient de variation de la longueur entre les différents récipients des témoins doit être ≤ 20 %.

1.7.5.6. *Poids*

À la fin de l'essai, chaque individu peut être pesé; le poids sec (24 heures à 60° C) est préférable au poids frais (poissons essuyés). Généralement, dans un essai correctement exécuté, le coefficient de variation du poids entre les différents récipients des témoins doit être ≤ 20 %.

Ces observations permettront de livrer une partie ou la totalité des données suivantes à l'analyse statistique:

— mortalité cumulée,

— nombre de larves saines à la fin de l'essai,

— moment du commencement de l'éclosion et de la fin de celle-ci (90 % d'œufs éclos dans chaque enceinte de concentration identique),

— nombre de larves écloses chaque jour,

— longueur (et poids) des animaux survivants à la fin de l'essai,

— nombre de larves déformées ou d'aspect anormal,

— nombre de larves présentant un comportement anormal.

▼B

2. **RÉSULTATS ET RAPPORT**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Il est recommandé qu'un statisticien participe à la fois à la conception et à l'analyse de l'essai, puisque cette méthode autorise des variations considérables dans la procédure expérimentale, par exemple en ce qui concerne le nombre d'enceintes expérimentales, le nombre de concentrations d'essai, le nombre initial d'œufs fécondés et les paramètres mesurés. Compte tenu des choix possibles dans la conception de l'essai, on ne donnera pas ici d'orientations précises sur les méthodes statistiques.

Si la CMEO et la CSEO doivent être estimées, il sera nécessaire d'analyser les variations au sein de chaque série d'enceintes de concentration identique par l'analyse de la variance ou les méthodes avec tableau de contingence. La méthode de Dunnett peut être utile pour procéder à des comparaisons multiples entre les résultats obtenus à chaque concentration et ceux des témoins (12) (13). Il existe d'autres exemples pertinents (14) (15). La grandeur de l'effet détectable par l'analyse de la variance ou par d'autres méthodes (c'est-à-dire la puissance de l'essai) devrait être calculée et mentionnée dans le rapport. Il faut savoir que les observations énumérées au point 1.7.5.6 ne se prêtent pas toutes au traitement statistique par l'analyse de la variance. À titre d'exemple, la mortalité cumulée et le nombre de larves saines à la fin de l'essai pourraient être analysés à l'aide de méthodes des probits.

S'il y a lieu d'estimer la CL et la CE_X, une courbe adéquate, telle que la courbe logistique, doit être ajustée aux résultats étudiés par une méthode statistique telle que la méthode des moindres carrés ou des moindres carrés non linéaires. La ou les courbes doivent être paramétrées de façon que la CL et la CE, recherchées et leur écart-type puissent être estimés directement. Cela facilitera beaucoup le calcul des limites de confiance autour de la CL et de la CE_X. À moins d'avoir de bonnes raisons de préférer d'autres niveaux de confiance, des limites de confiance de 95 % de part et d'autre devraient être choisies. La procédure d'ajustement devrait, de préférence, permettre d'évaluer la signification du manque d'ajustement. Des méthodes graphiques d'ajustement des courbes peuvent être utilisées. Toutes les observations énumérées au point 1.7.5.6 se prêtent à l'analyse de régression.

2.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats doivent être interprétés avec prudence, lorsque les concentrations mesurées des produits toxiques dans les solutions d'essai sont proches des limites de détection de la méthode d'analyse. L'interprétation des résultats concernant les concentrations supérieures à la solubilité de la substance dans l'eau doit aussi se faire avec prudence.

2.3. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

2.3.1. **Substance d'essai**

— État physique et propriétés physico-chimiques pertinentes,

— données relatives à l'identification chimique, notamment la pureté et la méthode d'analyse quantitative de la substance d'essai, s'il y a lieu.

▼B

2.3.2. **Espèce d'expérience**

— Nom scientifique, variété, nombre de poissons parents (c'est-à-dire nombre de femelles utilisées pour fournir le nombre d'œufs requis par l'essai), source et méthode de collecte des œufs fécondés et manipulations ultérieures.

2.3.3. **Conditions d'essai**

— Méthode utilisée (par exemple, semi-statique ou dynamique, temps écoulé entre la fécondation et le début de l'essai, charge, etc.),

— photopériode(s),

— conception de l'essai (par exemple, nombre d'enceintes expérimentales et d'exemplaires de même concentration, nombre d'embryons par exemplaire),

— méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (l'agent solubilisant et sa concentration doivent être spécifiés, le cas échéant),

— concentrations nominales de l'essai, valeurs mesurées dans les récipients d'essai, moyennes et écarts-types de celles-ci et méthode de détermination; si la substance d'essai est soluble dans l'eau à des concentrations inférieures à celles qui ont été testées, il faut démontrer que les mesures se réfèrent aux concentrations de la substance d'essai dans la phase dissoute,

— caractéristiques de l'eau de dilution: pH, dureté, température, concentration d'oxygène dissous, teneur en chlore résiduel (si elle a été mesurée), carbone organique total, solides en suspension, salinité du milieu d'essai (si elle a été mesurée) et toute autre mesure effectuée,

— qualité de l'eau dans les récipients d'essai, pH, dureté, température et concentration d'oxygène dissous.

2.3.4. **Résultats**

— Résultats des éventuelles études préliminaires sur la stabilité de la substance d'essai,

— données montrant que les témoins répondent à la norme générale d'acceptabilité relative à la survie de l'espèce (appendices 2 et 3),

— résultats concernant la mortalité et la survie aux stades de l'embryon et de la larve et taux de mortalité et de survie globaux,

— délais d'éclosion et nombre d'œufs éclos,

— longueur (et poids),

— description et fréquence des anomalies morphologiques, le cas échéant,

— description et fréquence des effets sur le comportement, le cas échéant,

— analyse statistique et traitement des données,

— pour les essais soumis à l'analyse de la variance, la concentration minimale avec effet observé (CMEO) à $p = 0,05$ et la concentration sans effet observé (CSEO) pour chaque réponse évaluée, ainsi qu'une description des méthodes statistiques utilisées et une indication de la grandeur de l'effet qui peut être détecté.

▼B

— pour les essais analysés à l'aide de techniques de régression, la CL et la CE_x et leurs intervalles de confiance et un graphique du modèle ajusté utilisé pour les calculer,

— justification de tout écart par rapport à la présente méthode d'essai.

3. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) Kristensen P. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FEES Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 pp. June 1990.

(2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.

(3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, p. 128, Ecological Research Scries EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, pp. 121-173.

(6) Legault R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp. 328-330.

(7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish *(Brachydanio rerio)* Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry. 6, pp. 61-71.

(8) Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp. 807-821.

(9) Van Leeuwen C. J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout *(Salmo gairdneri)*. J. Aquatic Toxicology, 9, pp. 129-145.

(10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.

(12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

(15) Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp. 321-334.

(16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, 81 pp.

(17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury. Nickel. Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch, of Environmental Contamination and Toxicology, 21, pp. 126-134.

(18) Meyer A., Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology — an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: pp. 231-236.

(19) Ghillebaert F., Chaillou C, Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, pp. 19-28.

(20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias* latipes. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, *(Oryzias latipes)*. EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. O., Poccocic T. L., Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M. D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow *{Pimephales pwmelas)* larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, pp. 1189-1203.

(23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon E. K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.

(25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, in: W. S. Hoar and D. J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academic press, pp. 1-58.

Tableau 1A

Espèces de poissons recommandées pour l'essai

Eau douce
Oncorhynchus mykiss Truite arc-en-ciel (9) (16)
Danio rerio Danio (7) (17) (18)
Cyprinus caprio Carpe commune (8) (19)
Oryzias latipes Medaka (20) (21)
Pimephales promelas Tête-de-boule (8) (22)

▼B

Tableau 1B

Exemples d'autres espèces également utilisées et sur lesquelles on possède une bonne documentation

Eau douce	Eau salée
Carassius auratus Cyprin doré (8)	*Menidia peninsulae* Capucette nord-américaine (23) (24) (25)
Lepomis macrochirus Crapet arlequin (8)	*Clupea harengus* Hareng (24) (25)
	Gadus morhua Morue (24) (25)
	Cyprinodon variegalus Fondule tête de mouton (23) (24) (25)

▼B

Annexe 1

ORIENTATIONS POUR LA RÉALISATION D'UN ESSAI DE TOXICITÉ SUR LES EMBRYONS ET LES ALEVINS DU DANIO *(BRACHYDANIO RERIO)*

INTRODUCTION

Le danio est originaire de la côte de Coromandel. en Inde, où il peuple les rivières à courant rapide. C'est une espèce courante en aquarium, appartenant à la famille des carpes. Des informations sur les méthodes d'élevage et les soins à lui apporter se trouvent dans des manuels de référence sur les poissons tropicaux. Sa biologie et son utilisation dans la recherche liée à la pêche ont été passées en revue par Laale (1).

Ce poisson dépasse rarement 45 mm de longueur. Son corps cylindrique arbore 7 à 9 rayures horizontales bleu foncé et argentées. Ces rayures se prolongent dans les nageoires caudales et anales. Son dos est vert olive. Les mâles sont plus minces que les femelles. Les femelles sont plus argentées et leur abdomen est distendu, en particulier avant le frai.

Les poissons adultes sont capables de supporter de grandes fluctuations de température, de pH et de dureté. Toutefois, afin de disposer de poissons sains qui produisent des œufs de bonne qualité, il faut leur fournir des conditions optimales.

Pendant la parade nuptiale, le mâle poursuit la femelle et lui donne des coups de tête; les œufs sont fécondés dès qu'ils sont expulsés. Les œufs, qui sont transparents et non adhérents, tombent au fond où ils peuvent être mangés par les parents. Le frai est influencé par la lumière. Si la lumière du matin est suffisante, le poisson fraie habituellement au cours des premières heures qui suivent le lever du soleil.

Une femelle peut produire des pontes de plusieurs centaines d'œufs à des intervalles d'une semaine.

ÉTAT DES POISSONS PARENTS, REPRODUCTION ET PREMIERS STADES DE LA VIE

Un nombre adéquat de poissons sains est sélectionné et gardé dans une eau appropriée (voir à l'appendice 4 par exemple) pendant au moins deux semaines avant le frai prévu. Le groupe de poissons devrait s'être reproduit au moins une fois avant d'engendrer la série d'œufs utilisés dans l'essai. La densité des poissons durant cette période ne devrait pas excéder 1 gramme de poissons par litre. La densité pourra être plus élevée si l'eau est renouvelée régulièrement ou si on a recours à des systèmes de purification. La température des aquariums devrait être maintenue à 25 ± 2 °C. Les poissons devraient recevoir un régime alimentaire varié, qui pourrait se composer, par exemple, d'aliments déshydratés appropriés trouvés dans le commerce, d'Artemia vivants récemment éclos, de chironomidés, de *Daphnia* et de vers blancs de la famille des enchytréidés.

Deux méthodes ayant permis d'obtenir un lot suffisant d'œufs fécondés sains, en vue de l'essai, sont résumées ci-dessous:

i) Huit femelles et seize mâles sont placés dans un aquarium contenant 50 litres d'eau de dilution, protégé de la lumière directe. On évitera le plus possible de les perturber pendant au moins 48 heures. Un support de frai est disposé au fond de l'aquarium, pendant l'après-midi du jour qui précède le début de l'essai. Le support de frai se compose d'un cadre (en plexiglas ou dans un autre matériau adapté) de 5 à 7 cm de haut, muni d'un filet à grosse; mailles (2-5 mm) à son sommet et d'un filet à mailles fines (10-30 um) à sa base. Plusieurs «arbres à frai», consistait en une corde de nylon non torsadée, sont attachés au filet à grosses mailles du support. Après que les poissons on été laissés dans l'obscurité pendant 1 2 heures, on allume une faible lumière qui va déclencher le frai. 2 à 4 heure après le frai, le support de frai est retiré et les œufs sont récupérés. Le support de frai empêchera les poissons d manger les œufs et facilitera en même temps la collecte des œufs. Le groupe de poissons devra avoir frayé au moin une fois avant le frai qui donnera les oeufs destinés à l'essai.

▼B

ii) Cinq à dix poissons mâles et femelles sont gardés dans des aquariums individuels pendant au moins deux semaint avant le frai prévu. Après 5 à 10 jours, les abdomens des femelles seront distendus et leurs papilles génitales app, raîtront visiblement. Les poissons mâles n'ont pas de papilles. Le frai se déroule dans des cuves équipées d'un fat fond en filet (voir ci-dessus}. La cuve est remplie d'eau de dilution jusqu'à une hauteur de 5 à 10 cm au-dessus c filet. Une femelle et deux mâles sont placés dans la cuve un jour avant le frai prévu. La température de l'eau (portée progressivement à un degré au-dessus de la température d'acclimatation. On éteint la lumière et on évi autant que possible toute perturbation aux poissons. Au matin, une faible lumière est allumée, qui déclenchera frai. Après 2 à 4 heures, les poissons sont enlevés et les œufs récoltés. Si le nombre d'œufs nécessaire dépasse capacité de production d'une femelle, un nombre suffisant de cuves de frai peut être disposé en parallèle. En nota la capacité de reproduction de chaque femelle avant l'essai (taille de la ponte et qualité des œufs), on peut sélectio ner les femelles qui possèdent la capacité de reproduction la plus avantageuse pour l'essai.

Les œufs doivent être transférés vers les récipients d'essai dans des tubes en verre (diamètre intérieur supérieur ou égal à 4 mm) dotés d'une poire aspirante souple. La quantité d'eau accompagnant les œufs lors de leur transfert devrait être aussi faible que possible. Les œufs sont plus denses que l'eau et tombent hors du tube. Il faut veiller à ce que les œufs (et les larves) n'entrent pas en contact avec l'air. On procédera à un examen microscopique d'un ou de plusieurs échantillons de pontes, pour vérifier s'il n'y a pas d'anomalies aux premiers stades de développement. La désinfection des œufs n'est pas autorisée.

Le taux de mortalité des œufs est le plus élevé dans les 24 heures qui suivent la fécondation. On observe souvent une mortalité de 5 à 40 % durant cette période. Les œufs dégénèrent parce que la fécondation a échoué ou le développement ne se déroule pas normalement. La qualité des œufs d'une ponte semble dépendre de la femelle, certaines femelles produisant systématiquement des œufs de bonne qualité, tandis que d'autres n'y arrivent jamais. La vitesse de développement et d'éclosion varie aussi d'une ponte à l'autre. Les œufs dont la fécondation s'est bien déroulée et les alevins présentent un taux de survie élevé, normalement supérieur à 90 % pour cent. À 25 ^{o}C, les œufs éclosent 3 à 5 jours après la fécondation et le sac vitellin est absorbé environ 13 jours après la fécondation.

Le développement embryonnaire a été bien caractérisé par Hisaoka et Battle (2). Grâce à la transparence des œufs et des larves écloses, il est possible de suivre le développement des poissons et d'observer la présence de malformations. Environ 4 heures après le frai, les œufs fécondés peuvent être distingués des œufs non fécondés (3). Les œufs et les larves sont placés dans des récipients d'essai de petit volume puis examinés au microscope.

Les conditions d'essai qui s'appliquent aux premiers stades de la vie sont énumérées à l'appendice 2. Les valeurs optimales pour le pH et la dureté de l'eau de dilution sont respectivement de 7,8 et de 250 mg de $CaCO_3$/l.

CALCULS ET STATISTIQUES

Une démarche en deux étapes est proposée. Tout d'abord, on procède à l'analyse statistique des données concernant la mortalité, les anomalies du développement et le moment de l'éclosion. Ensuite, on évalue statistiquement la longueur corporelle des poissons pour les concentrations auxquelles aucun effet nuisible n'a été détecté sur l'ensemble de ces trois premiers paramètres. Cette démarche est souhaitable étant donné que le produit toxique peut sélectivement tuer les plus petits poissons, retarder l'éclosion et induire des malformations évidentes, et par conséquent fausser les mesures de la longueur. En outre, il y aura à peu près le même nombre de poissons à mesurer par traitement, ce qui garantira la validité de l'analyse statistique de l'essai.

▼B

DÉTERMINATION DE LA CL_{50} ET DE LA CE_{50}

Le pourcentage d'œufs et de larves survivants est calculé et corrigé en fonction de la mortalité chez les témoins à l'aide de la formule d'Abbott (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P}{C} \times 100\right)$$

où:

P = pourcentage de survivants corrigé

P' = pourcentage de survivants observé dans la concentration d'essai

C = pourcentage de survivants chez les témoins

Si possible, la CL_{50} devra être déterminée par une méthode appropriée à la fin de l'essai.

Si l'on souhaite intégrer les données relatives aux malformations morphologiques dans le traitement statistique de In CE_{50} on trouvera des indications à ce sujet dans l'article de Stephan (5).

ESTIMATION DE LA CMEO ET DE LA CSEO

L'essai de toxicité aux stades de l'embryon et de l'alevin vise notamment à comparer les expériences menées à des concentrations non nulles avec les témoins afin de déterminer la CMEO. Il y a donc lieu d'appliquer les méthodes de comparaisons multiples (6) (7) (8) (9) (10).

BIBLIOGRAPHIE

(1) Laale H. W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanïo* rerio) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10. pp. 121-173.

(2) Hisaoka K. K. and Battle H. I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio reno* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102. 311 pp.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, pp. 173-181.

(4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1-333.

(5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69-81.

(6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control.). Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

(7) Dunnett C. W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(8) Williams D. A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, pp. 103-117.

(9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, pp. 519-531.

(10) Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

Appendice 2

CONDITIONS ET DURÉE DE L'ESSAI ET CRITÈRES DE SURVIE POUR LES ESPÈCES RECOMMANDÉES

Espèce	Température (degrés C)	Salinité (‰)	Photopériode (heures)	Durée des stades (jours)		Durée habituelle de l'essai	Survie des témoins (% minimum)	
				Embryon	Alevin		Taux de réussite de l'éclosion	Après éclosion
EAU DOUCE								
Brachydanio rerio Danio	25 ± 1	—	12-16	3-5	8-10	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 5 jours après l'éclosion (8-10 jours)	80	90
Oncorhynchus mykiss Truite arc-en-ciel	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (3)	30-35	25-30	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 20 jours après l'éclosion (50-55 jours)	66	70
Cyprinus carpio Carpe commune	21-25	—	12-16	5	> 4	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (8-9 jours)	80	75
Oryzias latipes Medaka	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12-16	8-11	4-8	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 5 jours après l'éclosion (13-16 jours)	80	80
Pimephales promelas Tête-de-boule	25 ± 2	—	16	4-5	5	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (8-9 jours)	60	70

(1) Pour les embryons.
(2) Pour les larves.
(3) Obscurité pour les embryons et les larves jusqu'à une semaine après l'éclosion, sauf pendant qu'on les examine. Une lumière tamisée est ensuite appliquée jusqu'à la fin de l'essai.

▼B

Appendice 3

Conditions de l'essai, durée et critères de survie pour d'autres espèces sur lesquelles on possède une bonne documentation

Espèce	Température (degrés C)	Salinité (% 0)	Photopériode (heures)	Durée des stades (jours)		Durée habituelle de l'essai sur l'embryon et l'alevin	Survie des témoins (% minimum)	
				Embryon	Alevin		Taux de réussite de l'éclosion	Après éclosion
EAU DOUCE								
Carassius auratus Cyprin doré	24 ± 1	—	—	3-4	> 4	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (7 jours)	_	80
Léopomis macrochirus Crapet arlequin	21 ± 1	—	16	3	> 4	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (7 jours)	—	75
EAU SALÉE								
Menidia peninsulae Capucette nord-américaine	22-25	15-22	12	1,5	10	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 5 jours après l'éclosion (6-7 jours)	80	60
Clupea harengus Hareng	10 ± 1	8-15	12	20-25	3-5	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 3 jours après l'éclosion (23-27 jours)	60	80
Gadus morhua Morue	5 ± 1	5-30	12	14-16	3-5	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 3 jours après l'éclosion (18 jours)	60	80
Cyprinodon variegatus Fondule tête de mouton	25 ± 1	15-30	12	—	—	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4/7 jours après l'éclosion (28 jours)	> 75	80

▼B

APPENDICE 4

QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ACCEPTABLE

Substance	Concentrations
Matières particulaires	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	< 50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

▼B

C.16. ABEILLE DOMESTIQUE — ESSAI DE TOXICITÉ AIGUË PAR VOIE ORALE

1. MÉTHODE

La méthode décrite pour cet essai de toxicité aiguë reprend la ligne directrice n° 213 de l'OCDE (1998).

1.1. INTRODUCTION

Le présent essai de toxicité est une méthode d'essai en laboratoire destinée à évaluer la toxicité aiguë par voie orale des pesticides et d'autres produits chimiques pour des abeilles domestiques ouvrières adultes.

Lorsqu'on apprécie et évalue les caractéristiques toxiques d'une substance, il peut être nécessaire de déterminer sa toxicité aiguë par voie orale pour les abeilles domestiques, par exemple, lorsque des abeilles risquent d'être exposées à cette substance. L'essai de toxicité aiguë par voie orale vise à déterminer la toxicité intrinsèque des pesticides et d'autres produits chimiques pour les abeilles. Les résultats de cet essai devraient être mis à profit pour établir la nécessité d'une évaluation plus poussée. Cette méthode peut être utilisée, en particulier, dans des programmes séquentiels destinés à évaluer les risques des pesticides pour les abeilles, selon la progression suivante: essais de toxicité en laboratoire, essais en conditions semi-naturelles et essais sur le terrain (1). Les pesticides peuvent être testés en tant que substances actives ou en tant que préparations chimiques.

Un étalon de toxicité doit être utilisé pour vérifier la sensibilité des abeilles et la précision du protocole d'essai.

1.2. DÉFINITIONS

Toxicité aiguë par voie orale: effets nocifs se produisant dans un délai maximal de 96 heures après l'administration d'une dose unique de la substance d'essai par voie orale.

Dose: de substance d'essai consommée. La dose est exprimée en masse (µg) de substance d'essai par animal testé (µg/abeille). La dose réellement consommée par chaque abeille ne peut être calculée, étant donné que les abeilles sont nourries collectivement, mais il est possible d'estimer une dose moyenne (quantité totale de substance d'essai consommée/nombre d'abeilles testées par cage).

DL_{50} (dose létale 50 %) orale: dose unique d'une substance, obtenue par calcul statistique, susceptible d'entraîner la mort de 50 % des animaux lorsqu'elle est administrée par voie orale. La DL_{50} s'exprime en µg de substance d'essai par abeille. Pour les pesticides, la substance d'essai peut être une substance active ou une préparation chimique contenant une ou plusieurs substances actives.

Mortalité: un animal est noté comme mort lorsqu'il est complètement immobile.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Des abeilles domestiques ouvrières adultes *(Apis mellifera)* sont exposées à une gamme de doses de la substance d'essai dispersée dans une solution de saccharose. Elles reçoivent ensuite la même alimentation, mais sans la substance d'essai. La mortalité est notée quotidiennement durant au moins 48 heures et comparée aux valeurs des témoins. Si le taux de mortalité augmente entre 24 heures et 48 heures, tandis que la mortalité des témoins demeure à un niveau acceptable, c'est-à-dire $\leq$ 10 %, il convient d'allonger la durée de l'essai jusqu'à 96 heures au maximum. On analyse les résultats afin de calculer la DL_{50} à 24 heures et à 48 heures et, si l'étude est prolongée, à 72 heures et à 96 heures.

▼B

1.4. VALIDITÉ DE L'ESSAI

La validité de l'essai repose sur les conditions suivantes:

— le taux moyen de mortalité de l'ensemble des témoins ne doit pas dépasser 10 % à la fin de l'essai,

— la DL_{50} de l'étalon de toxicité se trouve dans la gamme spécifiée.

1.5. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.5.1. **Collecte des abeilles**

Il convient d'utiliser de jeunes abeilles ouvrières adultes de la même race, autrement dit des abeilles du même âge, nourries de la même façon, etc. Elles doivent provenir de colonies saines, correctement nourries, dépourvues autant que possible d'individus malades, possédant une reine dans la ruche, et dont on connaît l'histoire et l'état physiologique. Elles peuvent être collectées le matin du jour où elles seront utilisées ou la veille au soir et gardées dans les conditions de l'essai jusqu'au jour suivant. Les abeilles récoltées sur des cadres dépourvus de couvain conviennent. Il faut éviter de collecter les abeilles au début du printemps ou à la fin de l'automne parce qu'elles subissent un changement physiologique à ces époques. Si les essais doivent être effectués au début du printemps ou à la fin de l'automne, on peut faire éclore les abeilles dans une étuve et elles seront ensuite élevées pendant une semaine avec du pain d'abeille (pollen récolté sur les rayons) et une solution de saccharose. Les abeilles traitées avec des substances chimiques, telles que des antibiotiques, des antivarroa, etc., ne doivent pas être soumises à des essais de toxicité durant 4 semaines à partir de la fin du dernier traitement.

1.5.2. **Conditions d'encagement et d'alimentation**

On utilise des cages faciles à nettoyer et bien ventilées. Tout matériau approprié peut être employé, par exemple des cages en acier inoxydable, en toile métallique, en plastique, des cages jetables en bois, etc. Il est préférable de répartir les abeilles en groupes de dix par cage. La dimension des cages d'essai doit être adaptée au nombre d'abeilles, c'est-à-dire leur fournir un espace suffisant.

Les abeilles doivent être gardées à l'obscurité dans une salle d'expérience chauffée à une température de 25 ± 2 °C. L'humidité relative, comprise normalement entre 50 et 70 %, doit être enregistrée tout au long de l'essai. Les manipulations, et notamment le traitement et les observations, peuvent s'effectuer à la lumière (du jour). Les abeilles sont nourries avec une solution de saccharose dans l'eau dont la concentration finale s'élève à 500 g/1 (50 % en poids par unité de volume). Après que les doses d'essai ont été administrées, l'alimentation doit être fournie ad libitum. Le système d'alimentation doit permettre l'enregistrement de la prise de nourriture dans chaque cage (voir point 1.6.3.1). Un tube de verre (de quelque 50 mm de long et 10 mm de large, dont le diamètre de l'extrémité ouverte est rétréci à environ 2 mm) peut être utilisé.

1.5.3. **Préparation des abeilles**

Les abeilles récoltées sont réparties au hasard dans les cages d'essai qui, elles-mêmes, sont disposées au hasard dans la salle d'expérience.

▼B

Les abeilles peuvent être privées de nourriture pendant une durée maximale de 2 heures avant le début de l'essai. On recommande de faire jeûner les abeilles avant le traitement pour que le niveau de remplissage de leur tube digestif soit identique au début de l'essai. Les abeilles moribondes doivent être enlevées et remplacées par des abeilles saines avant le début de l'essai.

1.5.4. **Préparation des doses**

Si la substance d'essai est miscible dans l'eau, elle peut être dispersée directement dans une solution de saccharose à 50 %. Pour les produits de qualité technique et les substances peu solubles dans l'eau, des véhicules tels que des solvants organiques, des émulsifiants ou des dispersants peu toxiques pour les abeilles peuvent être utilisés (par exemple, de l'acétone, du diméthylformamide, du diméthylsulfoxyde). La concentration du véhicule dépend de la solubilité de la substance d'essai et doit être identique pour toutes les concentrations testées. Cependant, il convient généralement d'appliquer une concentration de 1 % pour le véhicule et de ne pas la dépasser.

Des solutions témoins appropriées doivent être préparées; autrement dit, si un solvant ou un dispersant ont été employés pour solubiliser la substance d'essai, deux groupes de témoins doivent être utilisés: une solution aqueuse et une solution de saccharose renfermant le solvant ou le véhicule à la même concentration que dans les solutions d'essai.

1.6. MODE OPÉRATOIRE

1.6.1. **Groupes testés et groupes témoins**

Le nombre de doses et de groupes d'essai testés par dose doit se prêter aux exigences statistiques de la détermination de la DL_{50}, avec des limites de confiance de 95 %. L'essai demande normalement 5 doses appartenant à une série géométrique dont le facteur n'excède pas 2,2 et qui englobe la DL_{50}. Toutefois, le facteur de dilution et le nombre de concentrations du traitement doivent être déterminés en fonction de la pente de la courbe de toxicité (dose en fonction de la mortalité) et en tenant compte de la méthode statistique choisie pour analyser les résultats. Un test de détermination de l'ordre de grandeur permet de choisir les concentrations appropriées pour le dosage.

Il faut tester au moins 3 groupes d'essai identiques, comportant chacun 10 abeilles, par concentration d'essai. Pas moins de 3 groupes témoins, comportant chacun 10 abeilles, devraient être testés parallèlement aux groupes traités. Des séries de témoins devraient également être incluses pour les solvants ou les véhicules utilisés (voir point 1.5.4).

1.6.2. **Étalon de toxicité**

Un étalon de toxicité doit être testé parallèlement aux groupes traités. Il faut sélectionner au moins 3 doses afin d'englober la valeur supposée de la DL_{50}. Chaque dose doit être testée dans au moins 3 cages contenant chacune 10 abeilles. L'étalon de toxicité préféré est le diméthoate, dont la DL_{50} par voie orale après 24 heures se situe entre 0,10 et 0,35 µg de substance active/abeille (2). D'autres étalons de toxicité pourraient toutefois être acceptables, s'il existe suffisamment de données qui permettent de vérifier la relation dose/effet escomptée (par exemple le parathion).

▼B

1.6.3. **Exposition**

1.6.3.1. *Administration des doses*

Il faut fournir à chaque groupe d'abeilles testé 100 à 200 µl d'une solution aqueuse de saccharose à 50 % contenant la substance d'essai à la concentration appropriée. Il est nécessaire d'administrer un volume plus grand dans le cas des produits peu solubles, peu toxiques ou peu concentrés dans la préparation, étant donné qu'il faut utiliser des proportions plus élevées dans la solution de saccharose. La quantité de nourriture traitée consommée par groupe doit être surveillée. Une fois vidé (généralement en 3 à 4 heures), le tube contenant la solution alimentaire traitée doit être retiré de la cage et remplacé par un tube contenant une solution de saccharose pure. Les solutions de saccharose sont ensuite fournies ad libitum. Pour certains composés, la nourriture traitée avec des concentrations élevées peut être rejetée par les abeilles, si bien que la quantité de nourriture consommée risque d'être faible ou nulle. Après 6 heures au maximum, la nourriture traitée non consommée doit être remplacée par une solution de saccharose pure. La quantité de nourriture traitée consommée doit être évaluée {par exemple, en mesurant le volume ou le poids de la nourriture traitée restante).

1.6.3.2. *Durée*

L'essai dure 48 heures après que la solution d'essai a été remplacée par une solution de saccharose pure. Si! a mortalité continue de s'accroître de plus de 10 % après les premières 24 heures, la durée de l'essai doit être prolongée jusqu'à 96 heures au maximum, à condition que la mortalité des témoins n'excède pas 10 %.

1.6.4. **Observations**

La mortalité est relevée 4 heures après le début de l'essai et ensuite 24 heures et 48 heures après que la dose a été administrée. Si une période d'observation prolongée est requise, d'autres évaluations devront être pratiquées à des intervalles de 24 heures jusqu'à 96 heures au maximum, à condition que la mortalité des témoins ne dépasse pas 10 %.

La quantité de solution alimentaire consommée par groupe doit être estimée. La comparaison entre les taux de consommation des solutions traitées et non traitées en l'espace de 6 heures peut donner une idée des qualités organoleptiques de la nourriture traitée.

Tous les effets se traduisant par des anomalies du comportement pendant la période d'essai doivent être notés.

1.6.5. **Essai limite**

Dans certains cas (par exemple, lorsqu'on s'attend à ce qu'une substance d'essai soit peu toxique), un essai limite peut être exécuté avec 100 µg de substance active/abeille afin de démontrer que la DL_{50} est supérieure à cette valeur. Le même protocole doit être appliqué, et notamment les 3 groupes d'essai identiques pour la dose testée, les témoins nécessaires, l'évaluation de la quantité de nourriture traitée consommée et l'utilisation d'un étalon de toxicité. Si on constate une mortalité, il convient de mener une étude complète. Si on observe des effets sublétaux (voir point 1.6.4), il faut les noter.

▼B

2. **RÉSULTATS ET RAPPORT**

2.1. RÉSULTATS

Les résultats doivent être récapitulés sous la forme de tableaux, montrant pour chaque groupe traité avec la substance d'essai ainsi que pour les témoins et les groupes traités avec l'étalon de toxicité, le nombre d'abeilles employé, la mortalité à chaque heure d'observation et le nombre d'abeilles présentant un comportement anormal. Les données de mortalité seront analysées par les méthodes statistiques appropriées (par exemple, la méthode des probits, la moyenne mobile, la probabilité binomiale) (3) (4). On trace les courbes dose/effet pour chaque moment d'observation recommandé (24 heures, 48 heures, et, si nécessaire, 72 heures, 96 heures) et on calcule les pentes des courbes et les doses létales 50 % (DL_{50}) avec des limites de confiance de 95 %. Les corrections relatives à la mortalité des témoins doivent s'effectuer selon la méthode d'Abbott (4) (5). Lorsque la nourriture traitée n'est pas complètement consommée, la dose de la substance d'essai consommée par groupe doit être déterminée. La DL_{50} doit être exprimée en µg de substance d'essai par abeille.

2.2. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

2.2.1. **Substance d'essai**

— État physique et propriétés physico-chimiques pertinentes (par exemple, stabilité dans l'eau, pression de vapeur),

— données relatives à l'identification chimique, notamment la formule structurale, la pureté (dans le cas des pesticides, l'identité et la concentration de la ou des substances actives).

2.2.2. **Espèce d'expérience**

— Nom scientifique, race, âge approximatif (en semaines), méthode et date de collecte,

— informations sur les colonies dans lesquelles les abeilles ont été récoltées, en particulier l'état de santé, toute maladie des adultes, les prétraitements éventuels, etc.

2.2.3. **Conditions d'essai**

— Température et humidité relative de la salle d'expérience,

— conditions d'encagement, en particulier le type, la dimension et le matériau des cages,

— méthodes de préparation des solutions mères et des solutions d'essai (le solvant et sa concentration doivent être indiqués, le cas échéant),

— conception de l'essai, par exemple, nombre et niveau des concentrations d'essai appliquées, nombre de témoins; pour chaque concentration d'essai et témoin: nombre de cages et nombre d'abeilles par cage,

— date de l'essai.

▼B

2.2.4. **Résultats**

— Résultats d'une étude préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur, le cas échéant,

— données brutes: mortalité à chaque dose testée et à chaque temps d'observation.

— courbes dose/effet à la fin de l'essai,

— valeurs de la DL_{50} avec des limites de confiance de 95 %, à chaque temps d'observation recommandé, pour la substance d'essai et l'étalon de toxicité,

— méthodes statistiques utilisées pour calculer la DL_{50},

— mortalité chez les témoins,

— autres effets biologiques observes ou mesurés, par exemple, comportement anormal des abeilles (y compris rejet de la dose d'essai), vitesse de consommation de la nourriture dans les groupes traités et non traités,

— tout écart par rapport au protocole décrit ici et toute autre information utile.

3. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, pp. 265-267.

▼B

C.17. ABEILLE DOMESTIQUE — ESSAI DE TOXICITÉ AIGUË PAR CONTACT

1. MÉTHODE

La méthode décrite pour cet essai de toxicité aiguë reprend la ligne directrice n° 214 de l'OCDE (1998).

1.1. INTRODUCTION

Le présent essai de toxicité est une méthode d'essai en laboratoire destinée à évaluer la toxicité aiguë par contact des pesticides et d'autres produits chimiques pour des abeilles domestiques ouvrières adultes.

Lorsqu'on apprécie et évalue les caractéristiques toxiques d'une substance, il peut être nécessaire de déterminer sa toxicité aiguë par contact pour les abeilles domestiques, par exemple lorsque des abeilles risquent d'être exposées à cette substance. L'essai de toxicité aiguë par contact vise à déterminer la toxicité intrinsèque des pesticides et d'autres produits chimiques pour les abeilles. Les résultats de cet essai devraient être mis à profit pour établir la nécessité d'une évaluation plus poussée. Cette méthode peut être utilisée, en particulier, dans des programmes séquentiels destinés à évaluer les risques des pesticides pour les abeilles, selon la progression suivante: essais de toxicité en laboratoire, essais en conditions semi-naturelles et essais sur le terrain (1). Les pesticides peuvent être testés en tant que substances actives ou en tant que préparations chimiques.

Un étalon de toxicité doit être utilisé pour vérifier la sensibilité des abeilles et la précision du protocole d'essai.

1.2. DÉFINITIONS

Toxicité aiguë par contact: effets nocifs se produisant dans un délai maximal de 96 heures après l'application locale d'une dose unique de la substance d'essai.

Dose: quantité de substance d'essai appliquée. La dose est exprimée en masse (μg) de substance d'essai par animal testé (μg/abeille).

DL_{50} (dose létale 50 %) par contact: dose unique d'une substance, obtenue par calcul statistique, susceptible d'entraîner la mort de 50 % des animaux lorsqu'elle est administrée par contact. La DL_{50} est exprimée en μg de substance d'essai par abeille. Pour les pesticides, la substance d'essai peut être une substance active ou une préparation chimique contenant une ou plusieurs substances actives.

Mortalité: un animal est noté comme mort lorsqu'il est complètement immobile.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Des abeilles domestiques ouvrières adultes sont exposées à une gamme de doses de la substance d'essai dissoute dans un véhicule approprié, par application directe sur le thorax (aérosol). L'essai dure 48 heures. Si le taux de mortalité augmente entre 24 heures et 48 heures, alors que la mortalité des témoins reste à un niveau acceptable, c'est-à-dire ≤ 10 %, il convient de prolonger l'essai jusqu'à 96 heures au maximum. La mortalité est notée tous les jours et comparée avec les valeurs des témoins. On analyse les résultats afin de calculer la DL_{50} à 24 heures et à 48 heures et, au cas où l'étude est prolongée, à 72 heures et à 96 heures.

▼B

1.4. VALIDITÉ DE L'ESSAI

La validité de l'essai repose sur les conditions suivantes:

— le taux moyen de mortalité de l'ensemble des témoins ne doit pas dépasser 10 % à la fin de l'essai,

— la DL_{50} de l'étalon de toxicité se trouve dans la gamme spécifiée.

1.5. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.5.1. **Collecte des abeilles**

Il convient d'utiliser de jeunes abeilles ouvrières adultes de la même race, autrement dit des abeilles du même âge, nourries de la même façon, etc. Elles doivent provenir de colonies saines, correctement nourries, dépourvues autant que possible d'individus malades, possédant une reine dans la ruche, et dont on connaît l'histoire et l'état physiologique. Elles peuvent être collectées le matin du jour où elles seront utilisées ou la veille au soir et gardées dans les conditions de l'essai jusqu'au jour suivant. Les abeilles récoltées sur des cadres dépourvus de couvain conviennent. Il faut éviter de collecter les abeilles au début du printemps ou à la fin de l'automne parce qu'elles subissent un changement physiologique à ces époques. Si les essais doivent être effectués au début du printemps ou à la fin de l'automne, on peut faire éclore les abeilles dans un incubateur et elles seront ensuite élevées pendant une semaine avec du pain d'abeille (pollen récolté sur les rayons) et une solution de saccharose. Les abeilles traitées avec des substances chimiques, telles que des antibiotiques, des antivarroa, etc., ne doivent pas être soumises à des essais de toxicité durant 4 semaines à partir de la fin du dernier traitement.

1.5.2. **Conditions d'encagement et d'alimentation**

On utilise des cages faciles à nettoyer et bien ventilées. Tout matériau approprié peut être employé, par exemple des cages en acier inoxydable, en toile métallique, en plastique, des cages jetables en bois, etc. La dimension des cages d'essai doit être adaptée au nombre d'abeilles, c'est-à-dire leur fournir un espace suffisant. Il est préférable de répartir les abeilles en groupes de dix par cage.

Les abeilles doivent être gardées à l'obscurité dans une salle d'expérience chauffée à 25 ± 2 °C. L'humidité relative, généralement comprise entre 50 et 70 %, doit être enregistrée tout au long de l'essai. Les manipulations, et notamment le traitement et les observations, peuvent s'effectuer à la lumière (du jour). La nourriture se compose d'une solution de saccharose dans l'eau dont la concentration finale s'élève à 500 g/l (50 % en poids par unité de volume), fournie ad libitum durant toute la durée de l'essai à l'aide d'une mangeoire pour abeilles. Celle-ci peut consister en un tube de verre (d'environ 50 mm de long et 10 mm de large, dont le diamètre de l'extrémité ouverte est rétréci à environ 2 mm).

1.5.3. **Préparation des abeilles**

Les abeilles récoltées peuvent être anesthésiées avec du dioxyde de carbone ou de l'azote en vue de l'application de la substance d'essai. La quantité d'anesthésiant utilisée et la durée de l'exposition doivent être réduites au minimum. Les abeilles moribondes doivent être enlevées et remplacées par des abeilles saines avant le début de l'essai.

1.5.4. **Préparation des doses**

La substance d'essai doit être appliquée sous la forme de solution dans un véhicule, à savoir un solvant organique ou de l'eau avec un agent mouillant. Parmi les solvants organiques, on préfère l'acétone, mais d'autres solvants organiques peu toxiques pour les abeilles peuvent être utilisés (par exemple, le diméthylformamide, le diméthylsulfoxyde). Dans le cas des préparations chimiques dispersées dans l'eau et des substances organiques fortement polaires non solubles dans les solvants organiques, les solutions peuvent être plus faciles à appliquer si elles sont préparées dans une solution faible d'un agent mouillant commercial (par exemple, Agral, Citowett, Lubrol, Triton, Tween).

▼B

Des solutions témoins appropriées doivent être préparées, autrement dit, si un solvant ou un dispersant ont été employés pour solubiliser la substance d'essai, deux groupes de témoins doivent être utilisés, l'un étant traité avec de l'eau et l'autre avec le solvant ou le dispersant.

1.6. MODE OPÉRATOIRE

1.6.1. **Groupes testés et groupes témoins**

Le nombre de doses et de groupes d'essai testes par dose doit se prêter aux exigences statistiques de la détermination de la DL_{50}, avec des limites de confiance de 95 %. L'essai demande normalement cinq doses appartenant à une série géométrique dont le facteur n'excède pas 2,2 et qui englobe la DL_{50}. Toutefois, le nombre de doses doit être déterminé en fonction de la pente de la courbe de toxicité (dose en fonction de la mortalité) et en tenant rompre *de* la méthode statistique choisie pour analyser les résultats. Un test de détermination de l'ordre de grandeur permet de choisir les doses appropriées.

Il faut tester au moins 3 groupes d'essai identiques, comportant chacun 10 abeilles, par concentration d'essai.

Pas moins de 3 groupes témoins, comportant chacun 10 abeilles, devraient être testes parallèlement aux groupes traités. Si on utilise un solvant organique ou un agent mouillant, 3 groupes supplémentaires de 10 abeilles chacun doivent être inclus pour le solvant ou l'agent mouillant.

1.6.2. **Étalon de toxicité**

Un étalon de toxicité doit être testé parallèlement aux groupes traités. Il faut sélectionner au moins 3 doses afin d'englober la valeur supposée de la DL_{50}. Chaque dose doit être testée dans au moins 3 cages contenant chacune 10 abeilles. L'étalon de toxicité préféré est le diméthoate, dont la DL_{50} par contact après 24 heures se situe entre 0,10 et 0,30 µg de substance active/abeille (2). D'autres étalons de toxicité pourraient toutefois être acceptables, s'il existe suffisamment de données qui permettent de vérifier la relation dose/effet escomptée (par exemple, le parathion).

1.6.3. **Exposition**

1.6.3.1. *Administration des doses*

Les abeilles anesthésiées sont traitées individuellement par application locale. Les abeilles sont réparties au hasard entre les groupes traites aux différentes doses et les groupes témoins. Un volume de 1 µl de solution contenant la substance d'essai à la concentration appropriée doit être appliqué à l'aide d'un micro-applicateur sur la face dorsale du thorax de chaque abeille. D'autres volumes peuvent être utilisés si cela se justifie. Après l'application, les abeilles sont réparties entre les cages d'essai dans lesquelles on distribue une solution de saccharose.

1.6.3.2. *Durée*

L'essai dure 48 heures. Si la mortalité augmente de plus de 10 % entre 24 heures et 48 heures, la durée de l'essai doit être prolongée jusqu'à 96 heures, à condition que la mortalité des témoins ne dépasse pas 10 %.

▼B

1.6.4. **Observations**

La mortalité est relevée 4 heures après l'application de la dose, puis 24 heures et 48 heures après celle-ci. Si une période d'observation prolongée est requise, d'autres évaluations devront être pratiquées à des intervalles de 24 heures pendant 96 heures au maximum, à condition que la mortalité des témoins ne dépasse pas 10 %.

Tous les effets se traduisant par des anomalies du comportement pendant la période d'essai doivent être notés.

1.6.5. **Essai limite**

Dans certains cas (par exemple lorsqu'on s'attend à ce qu'une substance d'essai soit peu toxique), un essai limite peut être exécuté avec 100 µg de substance active/abeille afin de démontrer que la DL_{50} est supérieure à cette valeur. Le même protocole doit être appliqué, et notamment les 3 groupes d'essai identiques pour la dose testée, les témoins nécessaires et l'utilisation d'un étalon de toxicité. Si on constate une mortalité, il convient de mener une étude complète. Si on observe des effets sublétaux (voir point 1.6.4), il faut les noter.

2. **RÉSULTATS ET RAPPORT**

2.1. RÉSULTATS

Les résultats doivent être récapitulés sous la forme de tableaux, montrant pour chaque groupe traité avec la substance d'essai, ainsi que pour les témoins et les groupes traites avec l'étalon de toxicité, le nombre d'abeilles employé, la mortalité à chaque heure d'observation et le nombre d'abeilles présentant un comportement anormal. Les données de mortalité seront analysées par les méthodes statistiques appropriées (par exemple, la méthode des probits, la moyenne mobile, la probabilité binomiale) (3) (4). On trace les courbes dose-effet pour chaque moment d'observation recommandé (24 heures, 48 heures, et, si nécessaire, 72 heures, 96 heures) et on calcule les pentes des courbes et les doses létales 50 % DL_{50}) avec des limites de confiance de 95 %. Les corrections relatives à la mortalité des témoins doivent s'effectuer selon la méthode d'Abbott (4) (5). La DL_{50} doit être exprimée en µg de substance d'essai par abeille.

2.2. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

2.2.1. **Substance d'essai**

— État physique et propriétés physico-chimiques pertinentes (par exemple, stabilité dans l'eau, pression de- vapeur),

— données relatives à l'identification chimique, notamment la formule structurale, la pureté (dans le cas des pesticides, l'identité et la concentration de la ou des substances actives).

2.2.2. **Espèce d'expérience**

— Nom scientifique, race, âge approximatif (en semaines), méthode et date de collecte,

— informations sur les colonies dans lesquelles les abeilles ont été récoltées, en particulier l'état de santé, toute maladie des adultes, les prétraitements éventuels, etc.

▼B

2.2.3. **Conditions d'essai**

— Température et humidité relative de la salle d'expérience,

— conditions d'encagement, en particulier le type, la dimension et le matériau des cages,

— modalités d'administration de la substance d'essai, par exemple, solvant utilisé, volume de solution d'essai appliqué, anesthésiants utilisés,

— conception de l'essai, par exemple, nombre et niveau des concentrations d'essai appliquées, nombre de témoins; pour chaque concentration d'essai et témoin: nombre de cages et nombre d'abeilles par cage,

— date de l'essai.

2.2.4. **Résultats**

— Résultats d'une étude préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur, le cas échéant,

— données brutes: mortalité à chaque concentration testée et à chaque temps d'observation,

— courbes dose/effet à la fin de l'essai,

— valeurs de la DL_{50} avec des limites de confiance de 95 %, à chaque temps d'observation recommandé, pour la substance d'essai et l'étalon de toxicité,

— méthodes statistiques utilisées pour calculer la DL_{50},

— mortalité chez les témoins,

— autres effets biologiques observés et toute réaction anormale des abeilles,

— tout écart par rapport au protocole décrit ici et toute autre information utile.

3. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151-165. March 1993.

(2) Cough, H. J., McIndoe, E. C, Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, pp. 265-267.

▼B

C.18. DÉTERMINATION DE L'ADSORPTION/DÉSORPTION AU MOYEN DE LA MÉTHODE PAR AGITATION

1. MÉTHODE

La méthode décrite reprend la ligne directrice n° 106 de l'OCDE sur l'adsorption/désorption dans les sols fondée sur la méthode par agitation (2000).

1.1. INTRODUCTION

La méthode s'inspire d'un test circulaire, d'un séminaire sur la sélection des sols pour le développement d'un essai d'adsorption (1) (2) (3) (4) et de certaines lignes directrices nationales (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Les études d'adsorption/désorption donnent des informations précieuses sur la mobilité des substances chimiques et leur répartition dans les trois compartiments de la biosphère (lithosphère, hydrosphère, atmosphère) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Ces informations servent à prédire et à évaluer certaines caractéristiques d'une substance: la capacité de dégradation (22) (23), de transformation et d'absorption par les organismes (24), la lixiviation à travers le sol (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28), la volatilité à partir du sol (21) (29) (30), le ruissellement à la surface du sol vers les eaux naturelles (18) (31) (32). Les données sur l'adsorption peuvent être utilisées à des fins de comparaison ou de modélisation (19) (33) (34) (35).

La distribution d'une substance chimique entre les phases solides et aqueuses est un processus complexe qui dépend d'un grand nombre de facteurs: nature chimique de la substance (12) (36) (37) (38) (39) (40), caractéristiques du sol (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49), mais aussi des conditions climatiques, telles que précipitations, température, ensoleillement, vent. La méthode présentée ici, qui est un modèle de laboratoire simplifié, ne permet pas d'expliquer entièrement les phénomènes et les mécanismes impliqués dans l'adsorption d'une substance chimique par le sol. Mais si elle n'est pas exhaustive, elle donne tout de même d'utiles informations sur les effets environnementaux de l'adsorption d'un produit chimique.

Voir également l'introduction générale.

1.2. OBJET DE LA MÉTHODE

La méthode vise à évaluer le comportement d'adsorption/désorption d'une substance dans les sols. Il s'agit d'obtenir une valeur de sorption permettant de prédire le partage d'une substance sous diverses conditions environnementales. Les coefficients d'adsorption à l'équilibre d'une substance chimique sur différents sols sont déterminés en fonction des caractéristiques du sol (par exemple, teneur en carbone organique, teneur en argile, texture, pH). Il faut utiliser plusieurs types de sols pour couvrir le plus grand nombre possible d'interactions d'une substance donnée avec des sols naturels.

La présente méthode considère l'adsorption comme la liaison d'une substance chimique à la surface des sols. Elle ne fait pas de distinction entre les différents processus d'adsorption (adsorption physique et chimique) et d'autres processus tels que la dégradation catalysée par la surface, l'adsorption de masse ou la réaction chimique. Elle ne tient pas compte de l'adsorption sur les particules colloïdales (diamètre < 0,2 μm) générées par les sols.

▼B

Les paramètres considérés comme les plus importants pour l'adsorption sont: la teneur en carbone organique (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48), la teneur en argile, la texture (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48), le pH (pour les composés ionisables) (3) (4) (42). D'autres sont susceptibles d'avoir une incidence sur l'adsorption: la capacité d'échange cationique réelle (CECR), la teneur en fer amorphe et en oxydes d'aluminium, notamment dans le cas des sols volcaniques et tropicaux (4), ainsi que la surface spécifique (49).

L'essai permet d'évaluer l'adsorption d'une substance chimique sur des sols de texture et de pH différents et n'ayant pas la même teneur en carbone organique et en argile. Il comprend trois phases:

Phase 1: Étude préliminaire servant à déterminer:

— le rapport sol/solution,

— le temps d'équilibre de l'adsorption et la quantité de substance adsorbée à l'équilibre,

— l'adsorption de la substance sur la surface des récipients d'essai et la stabilité de la substance durant l'essai.

Phase 2: Essai de sélection: l'adsorption est étudiée sur cinq sols différents. On détermine la cinétique d'adsorption avec une concentration unique ainsi que le coefficient de distribution K_d et K_{oc}.

Phase 3: Détermination des isothermes d'adsorption de Freundlich: cet essai sert à évaluer l'effet de la concentration sur le degré d'adsorption sur les sols.

Étude de la désorption par l'évaluation de la cinétique et des isothermes de désorption de Freundlich (appendice 1).

1.3. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Symbole	Définition	Unités
A_{t_i}	pourcentage d'adsorption au temps t_i	%
A_{eq}	pourcentage d'adsorption à l'équilibre	%
$m_s^{ads}(t_i)$	masse de substance adsorbée sur le sol à l'instant t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	masse de substance adsorbée sur le sol durant l'intervalle de temps Δt_i	µg
$m_s^{ads}(eq)$	masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption	µg
m_0	masse de substance dans le tube au début de l'essai	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	masse de substance mesurée dans une aliquote (v_a^A) au temps t_i	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	masse de substance dans la solution à l'équilibre d'adsorption	µg
m_{soil}	quantité de phase de sol exprimée en masse sèche du sol	g

▼B

Symbole	Définition	Unités
C_{st}	concentration massique de la solution de réserve	µg cm^{-3}
C_0	concentration massique initiale de la solution en contact avec le sol	µg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	concentration massique de la substance dans la phase aqueuse au temps t_i, lorsque l'analyse est effectuée	µg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	concentration de la substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption	µg g^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	concentration massique de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption	µg cm^{-3}
V_0	volume initial de la phase aqueuse en contact avec le sol durant l'essai d'adsorption	cm^3
v_a^A	volume de l'aliquote dans laquelle la substance est mesurée	cm^3
K_d	coefficient de répartition de l'adsorption	cm^{-3} g^{-1}
K_{oc}	coefficient d'adsorption normalisé basé sur la teneur en carbone organique	cm^3 g^{-1}
K_{om}	coefficient de la répartition normalisé basé sur la teneur en matière organique	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	coefficient d'adsorption de Freundlich	$\mu g^{1-1/n}$ $(cm^3)^{1/n} g^{-1}$
1/n	exposant de Freundlich	
D_{t_i}	pourcentage de désorption à l'instant t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	pourcentage de désorption durant l'intervalle de temps Δt_i	%
K_{des}	coefficient de désorption apparente	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	coefficient de désorption de Freundlich	$\mu g^{-1/n}$ $(cm^3)^{1/n}$ g^1
$m_{aq}^{des}(t_i)$	masse de substance désorbée à partir du sol à l'instant t_j	µg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	masse de substance désorbée à partir du sol durant l'intervalle de temps Δt_i	µg
$m_m^{des}(eq)$	masse de substance déterminée par analyse dans la phase aqueuse à l'équilibre de désorption	µg
$m_{aq}^{des}(eq)$	masse totale de substance désorbée à l'équilibre de désorption	µg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	masse de substance restant adsorbée sur le sol après l'intervalle de temps Δt_i	µg
m_{aq}^A	masse de substance résiduelle après atteinte de l'équilibre d'adsorption due à un volume de remplacement insuffisant	µg
$C_s^{des}(eq)$	concentration de la substance restant adsorbée dans le sol à l'équilibre de désorption	µg g^{-1}

▼B

Symbole	Définition	Unités
$C_{aq}^{des}(eq)$	concentration massique de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre de désorption	µg cm^{-3}
V_T	volume total de la phase aqueuse en contact avec le sol durant l'essai de cinétique de désorption réalisé avec la méthode séquentielle	cm^3
V_R	volume de surnageant extrait du tube après obtention de l'équilibre d'adsorption et remplacé par un volume identique d'une solution de 0,01 M de $CaCl_2$	cm^3
v_a^D	volume de l'aliquote extrait du tube (i) pour analyse lors de l'essai de cinétique de désorption réalisé avec la méthode séquentielle	cm^3
V_r^i	volume de solution extrait du tube (i) afin de mesurer la substance lors de l'essai de cinétique de désorption (méthode parallèle)	cm^3
V_r^F	volume de solution extrait du tube afin de mesurer la substance à l'équilibre de désorption	cm^3
MB	bilan matière	%
m_t	masse totale de substance extraite en deux étapes du sol et des parois du tube d'essai	µg
V_{rec}	volume de surnageant récupéré après l'équilibre d'adsorption	cm^3
P_{ow}	coefficient de partage octanol/eau	
pKa	constante de dissociation	
S_w	solubilité dans l'eau	g l^{-1}

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Des volumes connus de la substance, non marquée ou radiologiquement marquée, mélangée à des concentrations connues de $CaCl_2$0,01 M, sont ajoutés à des échantillons de sol d'un poids sec connu, préalablement équilibrés dans du $CaCl_2$0,01 M. Le mélange est agité pendant le temps requis. Les particules du sol en suspension sont séparées par centrifugation et, le cas échéant, par filtration, puis la phase aqueuse est analysée. La quantité de substance adsorbée sur le sol correspond à la différence entre la quantité de substance initialement présente dans la solution et la quantité restant à la fin de l'expérience (méthode indirecte).

La quantité de substance adsorbée peut également être directement calculée par l'analyse du sol (méthode directe). Cette méthode, qui consiste à extraire progressivement le sol au moyen d'un solvant approprié, est recommandée lorsque l'on ne peut pas déterminer avec précision les écarts de concentration de la substance dans la solution, par exemple dans les cas suivants: adsorption de la substance sur la surface des tubes d'essai, instabilité de la substance au cours de l'expérience, faible adsorption modifiant peu la concentration de la substance dans la solution, forte adsorption entraînant une faible concentration ne pouvant être mesurée avec précision. L'utilisation d'une substance radioactivement marquée permet d'éviter d'extraire le sol. On analyse dans ce cas la phase du sol par combustion et comptage à scintillation liquide. Cette dernière méthode, non spécifique, ne permet cependant pas de distinguer les produits primaires des produits de transformation. Elle ne devrait donc être utilisée que si la substance à tester reste stable pendant toute la durée de l'étude.

▼B

1.5. INFORMATION SUR LA SUBSTANCE

Les réactifs chimiques doivent être purs. On recommande l'emploi de substances non marquées de composition connue et présentant de préférence un degré de pureté d'au moins 95 % ou de substances radioactivement marquées de composition connue et radioactivement pures. Il faut appliquer des corrections pour tenir compte de la désintégration lorsque l'on emploie des traceurs à demi-vie courte.

Les paramètres suivants doivent être connus avant de réaliser un essai d'adsorption/désorption:

a) solubilité dans l'eau (A.6);

b) pression de vapeur (A.4) et/ou constante de la loi de Henry;

c) dégradation non biologique: hydrolyse en fonction du pH (C.7);

d) coefficient de partage (A.8);

e) biodégradabilité facile (C.4) ou transformation aérobie et anaérobie dans le sol;

f) pKa des substances ionisables;

g) photolyse directe dans l'eau (c'est-à-dire spectre d'absorption UV-Vis dans l'eau, rendement quantique, par exemple) et photodégradation sur le sol.

1.6. APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

L'essai est applicable aux substances chimiques pour lesquelles on dispose d'une méthode analytique suffisamment précise. La stabilité de la substance durant l'essai est un paramètre important qui peut influencer la fiabilité des résultats, notamment avec la méthode indirecte. Il faut donc vérifier la stabilité par une étude préliminaire. Si l'on observe une transformation durant l'essai, il est recommandé d'analyser le sol et les phases aqueuses lors de l'étude principale.

Des difficultés peuvent survenir avec des substances faiblement solubles dans l'eau ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}) ou avec des substances fortement chargées du fait que la concentration de la phase aqueuse ne peut pas être mesurée avec suffisamment de précision avec la méthode analytique. Il faut prendre d'autres mesures dans ces cas. Les moyens d'aborder ces problèmes sont traités dans les points correspondants.

Il faut veiller à éviter les pertes si l'on analyse des substances volatiles.

1.7. MODE OPÉRATOIRE

1.7.1. **Appareillage, réactifs chimiques**

Le laboratoire doit être équipé de l'équipement standard suivant:

a) tubes ou récipients d'essai. Il est important qu'ils soient:

— adaptés à la centrifugeuse afin de diminuer les erreurs de manipulation et de transfert,

— constitués d'un matériau inerte qui diminue l'adsorption de la substance sur les parois:

▼B

b) agitateur: agitateur vertical ou équipement équivalent: le sol doit être maintenu en suspension pendant l'agitation;

c) centrifugeuse: elle doit être de préférence à vitesse de rotation élevée (forces de centrifugation > 3 000 g, par exemple), à température contrôlée et capable d'éliminer de la solution aqueuse les particules d'un diamètre supérieur à 0,2 μm. Les récipients doivent être fermés durant l'agitation et la centrifugation afin d'éviter les pertes par volatilité et les pertes en eau; il est recommandé d'utiliser des couvercles désactivés (couvercles filetés recouverts de téflon, par exemple) afin de diminuer l'adsorption sur leur surface;

d) équipement facultatif; filtres stériles jetables d'une porosité de 0,2 μm. Le matériau filtrant doit être choisi avec soin afin d'éviter l'adsorption de la substance à sa surface; les filtres organiques sont déconseillés pour les substances peu solubles;

e) instrumentation analytique permettant de mesurer la concentration de la substance;

f) four de laboratoire permettant de maintenir une température de 103 à 110 °C.

1.7.2. **Caractérisation et sélection des sols**

Les sols doivent être caractérisés par les trois paramètres principalement responsables de la capacité d'adsorption: le carbone organique, la teneur en argile et la texture, le pH. Comme nous l'avons dit plus haut (voir le point «Objet de la méthode»), d'autres caractéristiques physico-chimiques peuvent influer sur l'adsorption/désorption d'une substance et elles doivent donc être prises en compte.

Les méthodes de caractérisation des sols revêtent une extrême importance car elles peuvent influencer les résultats de manière significative. Il est donc recommandé de mesurer le pH du sol dans une solution de $CaCl_2$, 0,01 M (la solution utilisée lors de l'essai d'adsorption/désorption) selon la méthode ISO correspondante (ISO 10390-1). Il est également conseillé de déterminer certaines autres propriétés du sol selon les méthodes standard (par exemple, manuel ISO de l'analyse des sols, «Handbook of Soil Analysis»). On peut ainsi faire reposer l'analyse des données relatives à la sorption sur des paramètres de sol harmonisés. La bibliographie donne quelques références de méthodes harmonisées d'analyse et de caractérisation des sols (50-52). L'utilisation de sols de référence est recommandée pour calibrer les méthodes d'essai des sols.

Le tableau 1 indique comment choisir les sols pour les essais d'adsorption/désorption. Les sept types de sols choisis se rencontrent dans des zones géographiques tempérées. Pour les substances ionisables, les sols sélectionnés doivent couvrir un large spectre de pH pour permettre d'évaluer l'adsorption de la substance sous sa forme ionisée et non ionisée. Le point 1.9 («Réalisation de l'essai») indique combien de sols différents doivent être utilisés durant les diverses phases de l'essai.

Si d'autres types de sols sont choisis, il faut les caractériser au moyen des mêmes paramètres et ils doivent présenter des propriétés aussi diverses que celles décrites dans le tableau 1, même s'ils ne remplissent pas tout à fait les critères.

▼B

Tableau 1

Aide à la sélection des échantillons de sol pour les essais d'adsorption/désorption

Type de sol	pH (dans le $CaCl_2$ 0,01 M)	Teneur en carbone organique (%)	Teneur en argile (%)	Texture du sol (1)
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65-80	argile
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20-40	limon argileux
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15-25	limons fins
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15-30	limon
5	< 4,0 - 6,0 (2)	< 0,5 - 1,5 (2) (3)	< 10-15 (2)	sable limoneux
6	> 7,0	< 0,5 - 1,0 (2) (3)	40-65	limon argileux/argile
7	< 4,5	> 10	< 10	sable/sable glaiseux

(1) Selon la FAO et le système américain (85).
(2) Les valeurs des variables doivent être comprises de préférence dans les limites du spectre indiqué. En cas de difficulté à trouver un sol approprié, des valeurs inférieures au minimum indiqué sont acceptées.
(3) Les sols contenant moins de 0,3 % de carbone organique risquent de perturber la corrélation entre la teneur en carbone organique et l'adsorption. Il est donc recommandé d'utiliser des sols présentant une teneur supérieure à 0,3 %.

1.7.3. **Collecte et stockage des échantillons de sols**

1.7.3.1. *Collecte*

Aucune technique ou instrument d'échantillonnage particulier n'est recommandée; la technique d'échantillonnage dépend des objectifs de l'étude (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Il convient de considérer les aspects suivants:

a) il faut disposer d'informations détaillées sur le site d'essai: localisation, couverture végétale, traitement aux pesticides et/ou aux engrais, adjuvants biologiques ou contamination accidentelle. Le site doit être décrit selon les recommandations de la norme ISO sur l'échantillonnage des sols (ISO 10381-6);

b) le site d'échantillonnage doit être défini par l'UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) ou par des coordonnées géographiques, de manière à pouvoir reconnaître ultérieure ment un sol particulier ou à définir un sol en fonction des divers systèmes de classification utilisés dans les différents pays. Il est également recommandé de prélever dans l'horizon A jusqu'à une profondeur maximale de 20 cm. Si un horizon O_h est présent dans le sol n° 7 en particulier, il doit être inclus dans l'échantillon.

Les échantillons sont transportés dans des conteneurs et dans des conditions thermiques propres à préserver au mieux les propriétés initiales du sol.

▼B

1.7.3.2. *Stockage*

Il est préférable d'utiliser des sols fraîchement prélevés. Si cela n'est pas possible, le sol peut être stocke à la température ambiante et maintenu au sec. Aucun temps de stockage maximal n'est recommandé, mais au-delà de trois ans, les sols doivent être à nouveau analyses avant l'emploi afin de vérifier leur teneur en carbone-organique, leur pH et leur CEC.

1.7.3.3. *Manipulation et préparation des échantillons d'essai*

Les sols sont séchés à l'air à la température ambiante (de préférence entre 20 et 25 °C). Ils sont désagrégés en appliquant des forces minimes de manière à modifier aussi peu que possible la texture originale, puis tamises pour ne conserver que les particules ≤ 2 mm. Le tamisage doit respecter les recommandations de la norme ISO sur l'échantillonnage des sols (ISO 10381-6). Une bonne homogénéisation est recommandée car elle améliore la reproductibilité des résultats. La teneur en eau de chaque sol est déterminée à partir de trois aliquotes par un réchauffement à 105 °C jusqu'à stabilisation du poids (environ 12 heures). Pour tous les calculs, la masse du sol se réfère à la masse sèche à l'étuve, c'est-à-dire au poids de sol diminué de la teneur en eau.

1.7.4. **Préparation de la substance d'essai devant être appliquée sur le sol**

La substance d'essai est dissoute dans une solution de $CaCl_2$ 0,01 M dans de l'eau distillée ou désionisée; la solution de $CaCl_2$ est utilisée comme solvant aqueux pour améliorer la centrifugation et diminuer les échanges de cations. La concentration de la solution mère doit être supérieure de 3 ordres de grandeur à la limite de détection de la méthode d'analyse utilisée. Ce seuil permet de faire des mesures précises avec la méthodologie employée lors de l'essai. Enfin, la concentration de la solution de réserve doit être inférieure à la solubilité dans l'eau de la substance.

Il est conseillé de préparer la solution de réserve immédiatement avant de l'appliquer sur le sol et de la conserver dans un récipient hermétique à l'abri de la lumière à une température de 4 °C. La durée de stockage dépend de la stabilité de la substance et de sa concentration dans la solution.

Un agent solubilisant peut être utilisé pour les substances peu solubles ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}) qui se dissolvent difficilement. Il doit être miscible avec l'eau, comme le méthanol ou l'acétonitrile: sa concentration ne doit pas dépasser 1 % du volume total de la solution de réserve et elle doit être inférieure à celle de la substance dans la solution qui entrera en contact avec le sol (de préférence moins de 0,1 %); il ne doit pas être un surfactant ou subir des réactions solvolytiques avec la substance d'essai. Le procès-verbal d'essai doit indiquer qu'un tel agent a été employé et en donner les raisons.

Un autre moyen de traiter les substances peu solubles consiste à introduire la substance d'essai dans le système d'essai à l'aide d'un solvant auxiliaire: la substance est dissoute dans un solvant organique, dont une fraction est ajoutée au système constitué par le sol et par une solution 0,01 M de $CaCl_2$ dans de l'eau distillée ou désionisée. La concentration du solvant organique dans la phase aqueuse devrait être aussi faible que possible et ne pas excéder en principe 0,1 %. L'expérimentateur devra toutefois tenir compte du fait que l'introduction de la substance à l'aide d'une solution organique est susceptible de nuire à la reproductibilité des volumes. La concentration de la substance d'essai et du solvant auxiliaire risquent donc de varier légèrement entre les essais et d'introduire une erreur supplémentaire.

▼B

1.8. CONDITIONS PRÉALABLES À LA RÉALISATION DE L'ESSAI D'ADSORPTION/DÉSORPTION

1.8.1. **Méthode analytique**

Un certain nombre de paramètres peuvent influencer la précision des mesures: la précision de la méthode d'analyse de la solution et des phases adsorbées, la stabilité et la pureté de la substance, le temps pour atteindre l'équilibre de sorption, l'étendue des variations de concentration de la solution, le rapport sol/solution et les modifications de la structure du sol au cours du processus d'équilibrage (35) (59-62). L'appendice 2 donne quelques exemples à ce propos.

La fiabilité de la méthode d'analyse doit être vérifiée selon la gamme de concentration susceptible d'être celle rencontrée durant l'essai. L'expérimentateur est libre d'élaborer une méthode appropriée présentant toutes les qualités requises en matière de précision, d'exactitude, de reproductibilité, de limites de détection et de récupération. L'expérience ci-dessous montre comment effectuer un tel essai.

Un volume approprié de $CaCl_2$, 0,01 M (100 cm^3, par exemple), est agité pendant 4 heures avec un certain poids de sol (20 g, par exemple) hautement adsorbant, c'est-à-dire riche en carbone organique et en argile. Le poids et le volume varient selon les besoins de l'analyse mais un rapport sol/solution de 1:5 constitue un bon point de départ. Le mélange est centrifugé et la phase aqueuse filtrée. Une partie de la solution de réserve de la substance est ajoutée à cette dernière afin d'obtenir une concentration nominale comprise dans la gamme de concentration correspondant à celle de l'essai. Ce volume ne doit pas excéder 10 % du volume final de la phase aqueuse afin de modifier aussi peu que possible la nature de la solution de prééquilibrage. La solution est ensuite analysée.

Un témoin constitué du système du sol et de la solution de $CaCl_2$ (sans substance d'essai) doit être ajouté afin de vérifier les artéfacts de la méthode d'analyse et les effets de matrice induits par le sol.

La chromatographie gaz-liquide (CGL), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), la spectrométrie (CG/spectrométrie de masse, HPLC/spectrométrie de masse) et le comptage à scintillation liquide (pour les substances radiologiquement marquées) figurent parmi les méthodes de mesure de la sorption. Un taux de récupération de 90 à 110 % de la valeur nominale est jugé satisfaisant quelle que soit la méthode d'analyse utilisée. La limite de détection de la méthode d'analyse doit être d'au moins de deux ordres de grandeur inférieure à la concentration nominale afin de permettre la détection et l'évaluation une fois que le partage est effectué.

Les caractéristiques et la limite de détection de la méthode utilisée pour effectuer les études d'adsorption déterminent les conditions d'essai et les résultats expérimentaux. La méthode présentée ici suit un protocole expérimental général et propose des solutions de rechange lorsque la méthode analytique ou les équipements de laboratoire imposent des limites.

▼B

1.8.2. **Choix de rapports sol/solution optimaux**

Les rapports sol/solution appropriés à l'étude de la sorption sont choisis en fonction du coefficient de répartition K_d et du degré relatif d'adsorption souhaité. Le changement de la concentration de la substance dans la solution détermine la précision statistique de la mesure, fondée sur la forme de l'équation d'adsorption et sur la limite de la méthode d'analyse, ainsi que l'exactitude avec laquelle elle permettra de détecter la substance contenue dans la solution. Il est donc utile de déterminer plusieurs rapports fixes présentant un pourcentage adsorbé supérieur à 20 % ou, de préférence, à 50 % (62), tout en veillant a ce que la concentration de la substance dans la phase aqueuse reste suffisamment élevée pour pouvoir être mesurée avec précision, notamment lorsque les pourcentages d'adsorption sont importants.

Une solution pratique consiste à choisir les rapports sol/solution en estimant la valeur du coefficient de répartition K_d lors d'études préliminaires ou par des techniques d'estimation bien établies (voir l'appendice 3). On peut ensuite porter sur un graphique le rapport sol/solution en fonction du coefficient de distribution pour différents pourcentages fixes d'adsorption (figure 1). Dans le graphique ci-dessous, on estime que l'équation d'adsorption est linéaire ([1]). La relation est obtenue en réécrivant l'équation 4 du K_d sous la forme suivante 1:

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1\right) K_d \qquad (1)$$

ou sous sa forme logarithmique, en supposant que $R = m_{soil}/V_0$ et $A_{eq}\,\%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)}\right] \qquad (2)$$

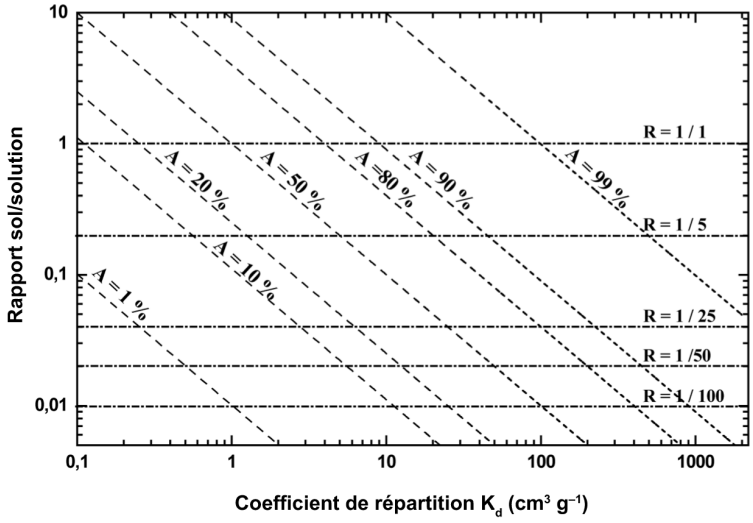


Figure 1. Relation entre les rapports sol/solution et K_d pour différents pourcentages d'adsorption de la substance

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$

▼B

La figure 1 montre le rapport sol/solution requis en fonction de K_d pour divers niveaux d'adsorption. Par exemple, avec un rapport sol/solution de 1:5 et un K_d de 20, l'adsorption serait de 80 % environ. Pour obtenir un pourcentage d'adsorption de 50 % avec le même K_d, il faudrait un rapport de 1:25. Cette méthode souple permet de choisir les rapports sol/solution en fonction des besoins de l'expérience.

Les zones où la substance est très fortement ou très légèrement adsorbée sont plus difficiles à maîtriser. En cas de faible absorption, un rapport sol/solution de 1:1 est recommandé, mais des ratios plus faibles peuvent être nécessaires avec certains types de sols très organiques afin d'obtenir une boue. Avec la méthode analytique, il faut veiller à mesurer les légères variations de concentration de la substance, faute de quoi la mesure d'adsorption sera inexacte. Avec un coefficient de distribution K_d très élevé, on peut aller jusqu'à un rapport de 1:100 de manière à conserver une quantité importante de substance en solution. Il faut cependant bien mélanger et donner au système le temps de s'équilibrer. On peut aussi prédire la valeur Kj au moyen de techniques d'estimation fondées par exemple sur la valeur P_{ow} (voir l'appendice 3). Cette méthode peut être utile pour les substances chimiques polaires ou faiblement adsorbées ayant un $P_{ow} < 20$ et pour les substances lipophiles ou fortement sorbantes dotées d'un $P_{ow} > 10^4$.

1.9. RÉALISATION DE L'ESSAI

1.9.1. Conditions de l'essai

Les essais sont réalisés à température ambiante et, si possible, à une température constante comprise entre 20 et 25 ^{o}C.

La centrifugation doit permettre d'éliminer de la solution les particules supérieures à 0,2 µm. Cette valeur correspond à la plus petite particule considérée comme une particule solide et constitue la limite entre les particules solides et les colloïdes. L'appendice 4 explique comment déterminer les paramètres de la centrifugation.

Si l'équipement de centrifugation ne permet pas d'éliminer à coup sûr les particules supérieures à 0,2 µm, on peut combiner la centrifugation et la filtration avec des filtres de 0,2 µm. Ces filtres doivent être fabriqués en matériau inerte afin d'éviter les pertes de substance. Il faut dans tous les cas apporter la preuve qu'il n'y a aucune perte de substance au cours de la filtration.

1.9.2. **Phase 1 — Étude préliminaire**

Le but de l'étude préliminaire a déjà été expliqué dans le point «Objet de la méthode». La réalisation de l'essai est exposée ci-après.

1.9.2.1. *Sélection de rapports sol/solution optimaux*

On utilise deux types de sols et trois rapports sol/solution (six essais). Un sol a une teneur en carbone organique élevée et une faible teneur en argile, l'autre une faible teneur en carbone organique et une teneur élevée en argile. Les rapports suivants sont proposés:

— 50 g de sol et 50 cm^3 de solution aqueuse de la substance d'essai (rapport 1:1),

▼B

— 10 g de sol et 50 cm^3 de solution aqueuse de la substance d'essai (rapport 1:5),

— 2 g de sol et 50 cm^3 de solution aqueuse de la substance d'essai (rapport 1:25).

La quantité minimale de sol qui va servir à l'expérience dépend de l'équipement de laboratoire dont on dispose et des performances des méthodes analytiques utilisées. Il est cependant recommandé d'utiliser au moins 1 g, de préférence 2 g, afin d'obtenir des résultats d'essai fiables.

Un échantillon de contrôle contenant uniquement la substance d'essai dans une solution de $CaCl_2$ 0,01 M (sans sol) est soumise exactement aux mêmes opérations que le système d'essai afin de vérifier la stabilité de la substance dans une solution de $CaCl_2$ et son adsorption éventuelle à la surface des récipients d'essai.

Un témoin par sol contenant la même quantité de sol dans un volume total de 50 cm^3 de solution de $CaCl_2$ 0,01 M (sans substance) est soumis à la même procédure d'essai. Il permet de détecter les substances étrangères ou les sols contaminés.

Tous les essais, contrôles et témoins sont réalisés au moins en double. Le nombre total d'échantillons devant être préparés pour l'étude est calculé selon la méthode suivie.

L'étude préliminaire et l'étude principale reposent sur les mêmes méthodes, sauf indication contraire.

Les échantillons de sols séchés à l'air sont mélangés à un volume minimal de 45 cm^3 de $CaCl_2$ 0,01 M et agités pendant 12 heures la nuit précédant l'expérience. On y ajoute par la suite de la solution de réserve de la substance d'essai afin d'obtenir un volume final de 50 cm^3. Ce volume ajouté ne doit pas excéder 10 % du volume final de la phase aqueuse (50 cm^3) afin de modifier aussi peu que possible la nature de la solution de prééquilibrage. Par ailleurs, la concentration initiale de la substance d'essai en contact avec le sol (C_0) doit être supérieure d'au moins deux ordres de grandeur à la limite de détection de la méthode analytique. Ce seuil permet d'obtenir des mesures fiables, même en cas d'adsorption élevée (> 90 %) et de déterminer ultérieurement les isothermes d'adsorption. La concentration (C_0) de la substance initiale ne devrait pas non plus excéder la moitié de sa limite de solubilité.

Voici comment calculer la concentration de la solution de réserve (C_M). Si la limite de détection est de 0,01 $\mu g\ cm^{-3}$ et l'adsorption de 90 %, la concentration initiale de la substance en contact avec le sol sera de préférence de 1 $\mu g\ cm^{-3}$ (soit de deux ordres de grandeur plus élevée que celle de la limite de détection). En supposant que l'on ajoute le volume maximal recommandé de la solution de réserve, soit 5 cm^3, aux 45 cm^3 de la solution d'équilibrage de $CaCl_2$ 0,01 M (c'est-à-dire 10 % de la solution de réserve au volume total de la phase aqueuse), la concentration de la solution de réserve sera de 10 $\mu g\ cm^{-3}$, ce qui est de trois ordres de grandeur supérieur à la limite de détection de la méthode analytique.

Il faut mesurer le pH de la phase aqueuse avant et après le contact avec le sol, compte tenu de son rôle dans le processus d'adsorption, notamment dans le cas des substances ionisables.

▼B

Le mélange est agité jusqu'à ce que le point d'équilibre soit atteint. Le temps d'équilibre dans les sols est très variable. Il dépend du produit chimique et du sol. Une période de 24 heures est généralement suffisante (77). Lors de l'étude préliminaire, des échantillons peuvent être prélevés de manière séquentielle pendant une période de mélange de 48 heures (à la 4^e, 8^e, 24^e et 48^e heure, par exemple). Les temps d'analyse ne sont pas rigides et doivent être considérés en fonction du programme de travail du laboratoire.

La substance dans la solution aqueuse peut être mesurée par la méthode parallèle ou par la méthode séquentielle. La méthode parallèle est plus difficile à réaliser sur le plan expérimental mais le traitement mathématique des résultats est plus simple (voir l'appendice 5). Le choix de la méthode est laissée à l'appréciation de l'expérimentateur, qui décide en fonction des équipements de laboratoire et des ressources disponibles.

a) Méthode parallèle: on prépare des échantillons avec un rapport sol/solution identique, leur nombre étant égal aux intervalles de temps auxquels on souhaite étudier la cinétique d'adsorption. Après centrifugation et, le cas échéant, filtration, la phase aqueuse du premier tube est récupérée aussi complètement que possible et mesurée au bout de 4 heures, par exemple, celle du deuxième tube au bout de 8 heures, celle du troisième au bout de 24 heures, etc.

b) Méthode séquentielle: on prépare uniquement un double échantillon pour chaque rapport sol/solution. Le mélange est centrifugé à des intervalles de temps définis afin de séparer les phases. Une petite aliquote de la phase aqueuse est immédiatement analysée afin de rechercher la substance, puis l'expérience se poursuit avec le mélange original. S'il y a filtration après centrifugation, le laboratoire doit disposer d'équipements permettant de filtrer de petites aliquotes en phase aqueuse. Le volume total des aliquotes ne devrait pas dépasser 1 % du volume total de la solution afin de ne pas modifier de manière significative le rapport sol/ solution et de diminuer la masse de soluté susceptible d'être adsorbée durant l'essai.

Le pourcentage d'adsorption A_{t_i} est calculé à chaque instant (t_j) sur la base de la concentration initiale nominale et de la concentration mesurée au temps d'échantillonnage (t_i), corrigé de la valeur du témoin. Des graphes A_{t_i} représentant en fonction du temps (figure 1, appendice 5) sont tracés afin de savoir à quel moment le plateau d'équilibre est atteint ([1]). On calcule également la valeur K_d à l'équilibre. On choisit à partir de cette valeur le rapport sol/solution approprié de la figure 1, de manière que le pourcentage d'adsorption dépasse 20 % et, de préférence, 50 % (61). Les équations et les principes relatifs au tracé sont exposés au point «Présentation des données» ainsi qu'à l'appendice 5.

1.9.2.2. *Détermination du temps d'adsorption et de la quantité de substance adsorbée à l'équilibre*

Comme nous l'avons déjà dit, le graphe représentant A_{t_i} ou C_{aq}^{ads} en fonction du temps permet d'estimer l'adsorption et la quantité de substance adsorbée à l'équilibre (voir les figures 1 et 2 de l'appendice 5). Le temps d'équilibre correspond au temps que le système met pour atteindre un plateau.

([1]) On peut également utiliser des graphiques de concentration de la substance en phase aqueuse (C_{aq}^{ads}) en fonction du temps pour estimer l'obtention du plateau d'équilibre (voir la figure 2 de l'appendice 5).

▼B

L'absence de plateau ou l'accroissement progressif de la courbe peut être dû à des facteurs complexes tels que b. biodégradation ou une diffusion lente. La biodégradation peut être mise en évidence en répétant l'expérience avec un échantillon de sol stérile. Si aucun plateau n'est atteint même dans ce cas, l'expérimentateur doit chercher d'autres causes inhérentes à l'étude. Il peut par exemple modifier les conditions de l'essai (température, temps d'agitation, rapport sol/solution). Lui seul décide de poursuivre la procédure d'essai, même s'il court le risque de ne pas atteindre un équilibre.

1.9.2.3. *Adsorption sur les parois du récipient et stabilité de la substance*

L'analyse des échantillons de contrôle peut fournir quelques informations sur l'adsorption de la substance sur les parois des récipients d'essai ainsi que sur sa stabilité. Une déplétion supérieure à l'écart type de la méthode analytique peut être due à une dégradation abiotique et/ou à l'adsorption sur les parois du récipient. On peut individualiser l'un ou l'autre de ces phénomènes en lavant soigneusement les parois du récipient avec un volume connu de solvant, puis en recherchant la substance dans la solution de lavage. L'absence d'adsorption sur les parois du récipient prouve l'instabilité abiotique de la substance. En cas d'adsorption, en revanche, il convient de modifier le matériau du récipient d'essai. Ces données sur l'adsorption sur les parois des récipients d'essai ne peuvent cependant pas être directement extrapolées à l'essai sol/solution, dans la mesure où la présence de sol modifie l'adsorption.

On peut obtenir des informations supplémentaires sur la stabilité de la substance d'essai en déterminant le bilan matière dans le temps. La substance est recherchée dans la phase aqueuse, dans les extraits de sol et sur les parois des récipients d'essai. La différence entre la masse de la substance ajoutée et la somme des masses de substance présentes dans la phase aqueuse, les extraits de sol et sur les parois des récipients correspond à la masse dégradée, volatilisée et/ou non extraite. Pour effectuer un bilan matière, l'équilibre d'adsorption doit être atteint durant l'essai.

Le bilan matière est effectué sur les deux sols et avec un rapport sol/solution par sol générant une déplétion à l'équilibre supérieure à 20 % et, de préférence, à 50 %. Une fois que l'essai consistant à trouver le rapport sol/solution est terminé (analyse du dernier échantillon de phase aqueuse au bout de 48 heures), les phases sont séparées par centrifugation et, le cas échéant, par filtration. Le maximum de phase aqueuse est récupérée puis un solvant d'extraction approprié (c'est-à-dire doté d'un coefficient d'extraction d'au moins 95 %) est ajouté au sol afin d'extraire la substance. Deux extractions successives au moins sont recommandées. On détermine ensuite la quantité de substance présente dans les extraits de sol et dans le récipient afin de calculer le bilan matière (équation 10 du chapitre «Présentation des données»). S'il est inférieur à 90 %, la substance est jugée instable durant la durée de l'essai. Les études peuvent être cependant poursuivies en tenant compte de cette instabilité. Il est conseillé dans ce cas d'analyser les deux phases lors de l'étude principale.

▼B

1.9.2.4 *Phase 2 — Cinétique d'adsorption avec une concentration unique de substance*

Cinq sols choisis dans le tableau 1 sont utilisés à cet effet. On a intérêt à y inclure tout ou partie des sols utilisés dans l'étude préliminaire. Dans ce cas, ils ne sont pas soumis aux essais de la phase 2.

Le temps d'équilibrage, le rapport sol/solution, le poids de l'échantillon de sol, le volume de la phase aqueuse en contact avec le sol et la concentration de la substance d'essai dans la solution sont choisis en fonction des résultats de l'étude préliminaire. L'analyse doit être effectuée de préférence après un temps de contact de 2, 4, 6, 8 (éventuellement 10) et 24 heures. Le temps d'agitation peut être étendu à 48 heures maximum lorsque les résultats sur le rapport sol/solution font ressortir un temps d'équilibrage plus long. Les temps d'analyse doivent être considérés avec une certaine souplesse.

Chaque expérience (un sol et une solution) est effectuée au moins en double afin d'évaluer la variance des résultats. Un témoin est préparé pour chacune d'elle avec du sol et de la solution de $CaCl_2$0,01 M, sans substance d'essai, d'un poids et d'un volume identiques aux échantillons d'essai. Un échantillon de contrôle préparé uniquement à partir de la substance d'essai contenue dans une solution de $CaCl_2$0,01 M (sans sol) est soumis à la même procédure d'essai afin de se prémunir contre l'imprévu.

Le pourcentage d'adsorption est calculé à chaque instant A_{t_i} et/ou intervalle de temps $A_{\Delta t_i}$ (selon les besoins). Il est porté sur un graphe en fonction du temps. Le coefficient de distribution K_d à l'équilibre ainsi que le coefficient d'adsorption normalisé basé sur la teneur en carbone organique K_{oc} (pour les substances chimiques non polaires) sont également calculés.

Résultats de l'essai de cinétique d'adsorption

La valeur linéaire K_d, qui exprime la mobilité inhérente des substances chimiques dans le sol, est généralement suffisamment précise pour décrire le comportement de sorption du sol (35)(78). Les substances chimiques dont K_d est ≤ 1 cm^3 g^{-1} sont en général considérées comme étant mobiles. Mac Gall et coll. ont élaboré un système de classification de la mobilité fondé sur les valeurs K_{oc} (16). Il existe également des systèmes de classification de la lixiviation fondés sur la relation entre K_{oc} et DT-50 ([1]) (32) (79).

Selon les études d'analyse d'erreurs (61), les valeurs K_d inférieures à 0,3 cm^3 g^{-1} ne peuvent pas être estimées avec précision à partir d'une diminution de la concentration dans la phase aqueuse, même si l'on applique le rapport sol/solution le plus favorable (sur le plan de la précision), c'est-à-dire 1:1. Dans ce cas, l'analyse des deux phases (sol et solution) est recommandée.

([1]) DT-50: temps de dégradation de 50 % de la substance d'essai.

▼B

En ce qui concerne les remarques précédentes, il est conseillé de poursuivre l'étude du comportement de sorption d'un produit chimique dans le sol et de sa mobilité potentielle en déterminant les isothermes d'adsorption de Freundlich des systèmes dont on peut déterminer précisément K_d grâce au protocole expérimental suivi dans la présente méthode. Il suffit pour cela que la valeur obtenue en multipliant K_d avec le rapport sol/solution soit > 0,3 — lorsque les mesures reposent sur la baisse de concentration de la phase aqueuse (méthode indirecte) — ou > 0,1 lorsque les deux phases sont analysées (méthode directe) (61).

1.9.2.5 *Phase 3 — Isothermes d'adsorption, cinétique de désorption et isothermes de désorption*

1.9.2.5.1 Isothermes d'adsorption

On utilise cinq concentrations de substances d'essai couvrant de préférence deux ordres de grandeur. La solubilité dans l'eau et les concentrations à l'équilibre de la phase aqueuse qui en résultent sont prises en compte lors du choix de ces concentrations. Il convient de garder le même rapport sol/solution par sol tout au long de l'étude. L'essai d'adsorption est effectué selon la description ci-dessus, à la différence près que la phase aqueuse est analysée une seule fois, au moment où le point d'équilibre déterminé au cours de la phase 2 est atteint. Les concentrations à l'équilibre dans la solution sont déterminées et la quantité adsorbée est calculée à partir de la déplétion de la substance dans la solution ou avec la méthode directe. La masse adsorbée par unité de masse de sol est portée sur un graphe en fonction de la concentration à l'équilibre de la substance (voir le chapitre «Présentation des données»).

Résultats de l'essai relatif aux isothermes d'adsorption

De tous les modèles mathématiques d'adsorption proposés jusqu'à présent, l'isotherme de Freundlich est le plus fréquemment utilisé pour décrire les processus d'adsorption. On peut trouver de plus amples informations sur l'interprétation et l'importance des modèles d'adsorption dans la bibliographie (41) (45) (80) (81) (82).

Remarque: il est bon de mentionner qu'une comparaison des valeurs K_F (coefficient d'adsorption de Freundlich) de différentes substances n'est possible que si ces valeurs sont exprimées en unités identiques (83).

1.9.2.5.2 Cinétique de désorption

Cet essai vise à évaluer le caractère réversible ou irréversible de l'adsorption d'une substance sur un sol. C'est une information importante dans la mesure où le processus de désorption joue un rôle non négligeable dans le comportement d'une substance chimique dans un sol. Ces données sur la désorption peuvent également servir à élaborer des modèles informatisés de simulation du lessivage et de l'écoulement des substances dissoutes. Si l'on souhaite effectuer une étude de désorption, il est conseillé d'effectuer l'étude ci-après pour tous les systèmes dont on aura pu déterminer Kd au cours de l'essai sur la cinétique d'adsorption précédent.

Comme pour l'étude sur la cinétique d'adsorption, l'essai sur la cinétique de désorption peut se faire selon la méthode parallèle ou la méthode séquentielle. Le choix de la méthode est laissé à l'appréciation de l'expérimentateur, qui devra considérer les disponibilités en équipements de laboratoire et en ressources.

▼B

a) méthode parallèle: on prépare, pour chaque sol inclus dans l'étude de désorption, des échantillons ayant un rapport sol/solution identique, leur nombre étant égal aux intervalles de temps auxquels on souhaite étudier la cinétique de désorption. Il est préférable d'utiliser les mêmes intervalles de temps que pour l'étude sur la cinétique d'adsorption. Le temps total peut cependant être étendu de manière que le système parvienne à l'équilibre de désorption. On prépare un témoin pour chaque expérience (un sol, une solution) à partir de sol et d'une solution de $CaCl_2$0,01 M (sans substance d'essai), d'un poids et d'un volume identiques à ceux de l'expérience. La substance d'essai dans une solution de $CaCl_2$0,01 M (sans sol) est soumise à la même procédure d'essai en tant qu'échantillon de contrôle. Tous les mélanges sol/solution sont agités jusqu'à l'équilibre d'adsorption (tel qu'il a été déterminé dans la phase 2). Les phases sont ensuite séparées par centrifugation et les phases aqueuses sont extraites le plus complètement possible. Le volume de solution extrait est remplacé par un volume égal de $CaCl_2$0,01 M ne contenant pas de substance d'essai et ces mélanges sont à nouveau agités. La phase aqueuse du premier tube est récupérée le plus complètement possible puis mesurée après 2 h, par exemple, celle du deuxième tube après 4 h, celle du troisième après 6 h, etc., jusqu'à ce que l'équilibre de désorption soit atteint.

b) méthode séquentielle: après l'essai de cinétique d'adsorption, le mélange est centrifugé et la phase aqueuse est extraite le plus complètement possible. Le volume de solution extrait est remplacé par un volume égal de $CaCl_2$0,01 M sans substance d'essai. Ce mélange est agité jusqu'à ce que l'équilibre de désorption soit atteint. Pendant ce temps, le mélange est centrifugé à des intervalles de temps définis afin de séparer les phases. Une petite aliquote de la phase aqueuse est immédiatement analysée afin de rechercher la substance d'essai, puis on poursuit l'expérience avec le mélange original. Le volume de chaque aliquote ne devrait pas dépasser 1 % du volume total. La même quantité de solution fraîche de $CaCl_2$0,01 M est ajoutée au mélange afin de maintenir le rapport sol/solution, puis celui-ci est agité jusqu'au prochain intervalle de temps.

Le pourcentage de désorption est calculé à chaque temps ((D_{t_i})) et/ou intervalle de temps ($(D_{\Delta t_i})$) (selon les besoins de l'étude), puis il est porté sur un graphique en fonction du temps. Le coefficient de désorption K_{des} à l'équilibre est également calculé. Toutes les équations applicables sont données dans le chapitre «Présentation des données» de l'annexe 5.

Résultats de l'essai de cinétique de désorption

L'inscription sur un même graphe du pourcentage de désorption D_{t_i} et d'adsorption A_{t_i} en fonction du temps permet d'estimer la réversibilité du processus d'adsorption. L'adsorption est jugée réversible si l'équilibre de désorption est atteint avant le double de temps nécessaire à l'équilibre d'adsorption et si la désorption totale est supérieure à 75 % de la quantité adsorbée.

1.9.2.5.3 Isothermes de désorption

Les isothermes de désorption de Freundlich sont déterminés sur les sols utilisés lors de l'expérience relative aux isothermes d'adsorption. L'essai de désorption est réalisé selon les modalités décrites dans le chapitre «Cinétique de désorption», à la différence près que la phase aqueuse n'est analysée qu'une fois, à l'équilibre de désorption. On calcule ensuite la quantité de substance désorbée. La quantité de substance restant adsorbée sur le sol à l'équilibre de désorption est portée sur un graphe en fonction de la concentration d'équilibre de la substance d'essai en solution (voir le chapitre «Présentation des données» et l'annexe 5).

▼B

2. **PRÉSENTATION DES DONNÉES**

Les données analytiques sont présentées sous forme de tableaux (voir l'annexe 6) dans lesquels figurent les mesures et les moyennes calculées. Les isothermes d'adsorption sont représentés sous forme de graphiques. Les calculs sont effectués selon les modalités présentées ci-après.

Pour les besoins de l'essai, on estime que le poids de 1 cm^3 de solution aqueuse est de 1 g. Le rapport sol/solution peut être exprimé en M/M ou M/vol.

2.1 ADSORPTION

L'adsorption (A_{t_i}) est définie comme le pourcentage de substance adsorbée sur le sol en fonction de la quantité présente au début de l'essai, dans les conditions de l'essai. Si la substance est stable et qu'elle n'adsorbe pas de manière significative sur la paroi du récipient, A_{t_i} est calculé à chaque instant t_i selon l'équation suivante:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0}(\%) \quad (3)$$

où:

A_{ti} = est le pourcentage d'adsorption à l'instant t_i (%);

$m_s^{ads}(t_i)$ = est la masse de substance d'essai adsorbée sur le sol durant le temps t_i (µg);

m_0 = est la masse de substance dans le tube au début de l'essai (µg).

L'annexe 5 donne des informations détaillées sur le mode de calcul du pourcentage d'adsorption A_{t_i} avec les méthodes parallèles et séquentielles.

Le coefficient de répartition K_d est le rapport entre le contenu de la substance dans le sol et sa concentration massique dans la solution aqueuse, dans les conditions d'essai, lorsque l'équilibre d'adsorption est atteint.

Soit:

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \quad (4)$$

où:

$C_s^{ads}(eq)$ = est la concentration de la substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption (µg g^{-1});

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = est la concentration massique de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption (µg cm^{-3}). Elle est déterminée par analyse en tenant compte des valeurs données par les témoins.

$m_s^{ads}(eq)$ = est la masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption (µg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = est la masse de substance dans la solution à l'équilibre d'adsorption (µg);

m_{soil} = est la quantité de phase de sol exprimée en masse sèche de sol (g);

V_0 = est le volume initial de la phase aqueuse en contact avec le sol (cm^3).

La relation entre A_{eq} et K_d est donnée par l'équation suivante:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \quad (5)$$

▼B

où:

A_{eq} = est le pourcentage d'adsorption à l'équilibre d'adsorption (%).

Le coefficient normalisé basé sur la teneur en carbone organique K_{oc} lie le coefficient de répartition K_d à la teneur en carbone organique de l'échantillon de sol:

soit:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} (cm^3\ g^{-1}) \quad (6)$$

où:

%OC = est le pourcentage de carbone organique dans l'échantillon de sol ($g\ g^{-1}$).

Le coefficient K_{oc} représente une valeur unique qui caractérise principalement le partage de substances chimiques non polaires entre le carbone organique dans le sol ou sédiment et eau. L'adsorption de ces substances est liée à la teneur organique du solide adsorbant (7); les valeurs K_{oc} dépendent donc des caractéristiques spécifiques des fractions humiques dont la capacité de sorption varie considérablement selon l'origine, la genèse, etc.

2.1.1 **Isothermes d'adsorption**

L'équation des isothermes d'adsorption de Freundlich lie la quantité de substance adsorbée à la concentration de substance en solution à l'équilibre (équation 8).

Les données sont traitées comme dans le chapitre «Adsorption». On calcule pour chaque tube d'essai la quantité de la substance adsorbée sur le sol après l'essai d'adsorption ($C_s^{ads}(eq)$, noté ailleurs x/m). On suppose que l'équilibre a été atteint et que $C_s^{ads}(eq)$représente la valeur d'équilibre:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right].V_0}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

L'adsorption de Freundlich est donnée par l'équation suivante (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads}.C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

ou, sous sa forme linéaire, par:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

où:

K_F^{ads} = est le coefficient d'adsorption de Freundlich; il se mesure en $cm^3\ g^{-1}$ uniquement si 1/n = 1; dans tous les autres cas, la pente l/n s'écrit K_F^{ads} $(\mu g^{1-1/n}\ (cm^3)^{1/n} g^{-1})$;

n = est la constante de régression; l/n est généralement compris entre 0,7 et 1,0, ce qui indique que la donnée de sorption est fréquemment légèrement non linéaire.

Les équations (8) et (9) sont portées sur un graphique et les valeurs K_F^{ads} et l/n sont calculées au moyen d'une analyse de régression utilisant l'équation 9. Le coefficient de corrélation r^2 de l'équation logarithmique est également calculé. La figure 2 donne des exemples de graphes.

▼B

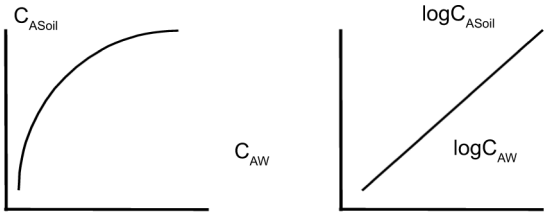


Fig. 2. Graphique d'adsorption de Freundlich, normalisé et linéarisé

2.1.2 **Bilan matière**

Le bilan matière (MB) correspond au pourcentage de substance récupéré par analyse après un essai d'adsorption par rapport à la quantité nominale de substance présente au début de l'essai.

Le traitement des données est différent si le solvant est complètement miscible avec l'eau. On peut dans ce cas appliquer le traitement des données visé au chapitre «Désorption» pour déterminer la quantité de substance extraite par solvant. Si celui-ci est moins miscible avec l'eau, il convient de déterminer la quantité récupérée.

Le bilan matière de l'adsorption est calculé de la manière suivante: on suppose que le terme (m_E) correspond à la somme des masses de substance extraites du sol et de la surface du récipient d'essai au moyen d'un solvant organique.

soit:

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E\right) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0}(\%) \quad (10)$$

où:

MB = est le bilan matière (%);

m_E = est la masse totale de substance extraite en deux étapes du sol et des parois du récipient (µg);

C_o = est la concentration massique initiale de la solution en contact avec le sol (µg cm^{-3});

V_{rec} = est le volume de surnageant récupéré à l'équilibre d'adsorption (cm^{-3}).

2.2 DÉSORPTION

La désorption (D) est définie comme le pourcentage de substance désorbée, rapporté à la quantité de substance préalablement adsorbée, dans les conditions d'essai:

soit:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (11)$$

où:

D_{ti} = est le pourcentage de désorption à l'instant t_i (%);

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = est la masse de substance désorbée à partir du sol à l'instant t_i, (µg);

$m_s^{ads}(eq)$ = est la masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption, (µg).

L'annexe 5 donne des informations détaillées sur la manière de calculer le pourcentage de désorption D_{t_i} par la méthode parallèle et séquentielle.

Le coefficient de désorption apparente (K_{des}) correspond, dans les conditions d'essai, au rapport entre le contenu de la substance restant dans la phase du sol et la concentration massique de la substance désorbée dans la solution aqueuse, lorsque l'équilibre de désorption est atteint:

soit:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (12)$$

où:

K_{des} = est le coefficient de désorption ($cm^3\ g^{-1}$);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = est la masse totale de substance désorbée à partir du sol à l'équilibre de désorption (µg);

V_T = est le volume total de la phase aqueuse en contact avec le sol durant l'essai de cinétique de désorption (cm^3).

Le chapitre «Désorption» de l'annexe 5 explique comment calculer $m_{aq}^{des}(eq)$.

Remarque

Si l'essai d'adsorption a été réalisé avec la méthode parallèle, le volume V_T de l'équation (12) est estimé égal à V_0.

2.2.1 **Isothermes de désorption**

L'équation des isothermes de désorption de Freundlich relie la quantité de la substance restant adsorbée sur le sol à la concentration de substance en solution à l'équilibre de désorption (équation 16).

La quantité de substance restant adsorbée sur le sol à l'équilibre de désorption est calculé pour chaque tube de la manière suivante:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ est défini comme:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^{A}(\mu g) \quad (14)$$

$C_s^{des}(eq)$ = est la quantité de la substance restant adsorbée sur le sol à l'équilibre de désorption (µg g^{-1});

$m_m^{des}(eq)$ = est la masse de substance déterminée par analyse dans la phase aqueuse à l'équilibre de désorption (µg);

▼B

m_{aq}^{A} = est la masse de substance restant après l'équilibre d'adsorption en raison d'un remplacement volumique incomplet µg);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = est la masse de substance en solution à l'équilibre d'adsorption (µg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = est le volume de solution prélevé du tube afin de mesurer la substance, à l'équilibre de désorption (cm^3)

V_R = est le volume de surnageant extrait du tube après obtention de l'équilibre d'adsorption et remplacé par le même volume de $CaCl_2$0,01 M (cm^3);

L'équation de la désorption de Freundlich s'écrit (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} \ (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

ou, sous une forme linéaire:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F{}^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}{}^{des}(eq) \quad (17)$$

où:

K_F^{des} = est le coefficient de désorption de Freundlich;

n = est la constante de régression;

$C_{aq}^{des}(eq)$ = est la concentration massique de substance dans la phase aqueuse à l'équilibre de désorption (µg cm^{-3}).

Les équations (16) et (17) peuvent être portées sur un graphique et les valeurs K_F^{des}et 1/n sont calculées au moyen d'une analyse de régression en utilisant l'équation 17.

Remarque:

Si l'exposant d'adsorption ou de désorption de Freundlich 1/n est égal à 1, les constantes d'adsorption ou de désorption de Freundlich (K_F^{ads} et K_F^{des}) sont identiques aux constantes d'adsorption ou de désorption à l'équilibre (K_d et K_{des}) et les graphiques de C_s en fonction de C_{aq} seront linéaires. Si les exposants ne sont pas égaux à 1, les graphiques de C_s en fonction de C_{aq} seront non linéaires et les constantes d'adsorption et de désorption varieront selon les isothermes.

2.2.2 **Procès-verbal d'essai**

Le procès-verbal doit comprendre les informations suivantes:

— Identification complète des échantillons de sol utilisés, à savoir:

— références géographiques du site (latitude, longitude);

— date de l'échantillonnage;

▼B

— origine (sol agricole, forêt, etc.);

— profondeur de l'échantillonnage;

— contenu en sable/limon/argile;

— valeurs du pH (dans $CaCl_2$ 0,01M);

— teneur en carbone organique;

— teneur en matière organique;

— teneur en azote;

— rapport C/N;

— capacité d'échange cationique (mmol/kg);

— toutes les informations sur la collecte et le stockage des échantillons de sol;

— le cas échéant, toutes les informations utiles à l'interprétation de l'adsorption et de la désorption de la substance testée;

— la référence aux méthodes utilisées pour déterminer chaque paramètre;

— le cas échéant, des informations sur la substance à tester;

— la température des essais;

— les conditions de centrifugation;

— le procédé utilisé pour analyser la substance;

— les raisons motivant l'emploi d'un agent solubilisant pour préparer la solution de substance de réserve;

— les raisons expliquant les corrections de calcul, le cas échéant;

— les données relatives au formulaire (annexe 6) et à la présentation graphique;

— toutes les informations et observations utiles pour interpréter les résultats des essais.

3. **BIBLIOGRAPHIE**

1. Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.

2. Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.

3. Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

4. OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).

5. US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

6. US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, 0PPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/ Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.

7. ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

8. Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

9. Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

10. Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

11. BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

12. Calvet R., (1989), «Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils», in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

13. Calvet R., (1980) «Adsorption-Desorption Phenomena» in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.

14. Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), «The sorption of nonpolar organics by soils and sediments» in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp 31-44.

15. van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), «An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media». Soil Sci. Soc. Am. Proc, Vol. 38(1), 29-35.

16. McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981), «Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis», in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

17. Lambert S.M., Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965), «Movement and sorption of chemicals applied to the soil». Weeds, 13, 185-190.

18. Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) «Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils». J.Agric.Food Chem., 18, 524-528.

19. Russell M.H., (1995), «Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil», in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

20. Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), «Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides», IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, 901-932.

▼B

21. Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), «Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils». Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp 137-157, BCPC, Surrey, UK.

22. Furminge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), «Persistence of herbicides in soil». J. Sci. Fd Agric, 18, 269-273.

23. Burkhard N., and Guth J.A., (1981), «Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption». Pestic. Sci. 12, 45-52.

24. Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977). «Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides». Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, 961-971.

25. Osgerby J.M., (1973), «Process affecting herbicide action in soil». Pestic. Sci., 4, 247-258.

26. Guth J.A., (1972), «Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden». Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, 143-154.

27. Hamaker J.W., (1975), «The interpretation of soil leaching experiments», in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.

28. Helling C.S., (1971), «Pesticide mobility in soils». Soil Sci. Soc. Amer. Proc, 35, 732-210.

29. Hamaker J.W., (1972), «Diffusion and volatilization» in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, 49-143.

30. Burkhard N. and Guth J.A., (1981), «Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system». Pestic. Sci. 12, 37-44.

31. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), «Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses», in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

32. Gustafson D.I., (1989), «Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide teachability». J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), 339-357.

33. Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). «Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils». J. of Soil Sci., 28, 340-350.

34. Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), «Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils». Pest. Sci., 11, 389-395.

35. Green R.E., and Karickoff S.W., (1990), «Sorption estimates for modeling», in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80- 101,

36. Lambert S.M., (1967), «Functional relationship between sorption in soil and chemical structure». J. Agri. Food Chem., 15, 572-576.

▼B

37. Hance R.J., (1969), «An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils». J. Agri. Food Chem., 17, 667-668.

38. Briggs G.G. (1969), «Molecular structure of herbicides and their sorption by soils». Nature, 223, 1288.

39. Briggs G.G. (1981). «Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor». J. Agric. Food Chem., 29, 1050-1059.

40. Sabljic A., (1984), «Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology». J. Agric. Food Chem., 32, 243-246.

41. Bailey G.W., and White J.L., (1970), «Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil». Residue Rev., 32, 29-92.

42. Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968), «Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate». Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32:222-234.

43. Karickhoff S.W., (1981) «Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils». Chemosphere 10, 833-846.

44. Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), «Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners». Environ. Toxicol. Safety 21, 1-17.

45. Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972). «Adsorption in organic chemicals» in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I, and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.

46. Deli J., and Warren G.F., 1971, «Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils». Weed Sci. 19:67-69.

47. Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), «Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils». Weed Science, Vol. 23, 454-457.

48. Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) «Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations» in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p. 75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

49. Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980), «Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase», CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

50. ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

51. Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 1 1th edition.

52. Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. «Methods of Soil Analysis», Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

53. ISO/DIS 10381-1 Soil Quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

54. ISO/DIS 10381-2 Soil Quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques.

55. ISO/DIS 10381-3 Soil Quality — Sampling — Part 3: Guidance on safety of sampling.

56. ISO/DIS 10381-4 Soil Quality — Sampling — Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

57. ISO/DIS 10381-5 Soil Quality — Sampling — Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

58. ISO 10381-6, 1993: Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

59. Green R.E., and Yamane V.K., (1970) «Precision in pesticide adsorption measurements». Soil Sci. Am. Proa, 34, 353-354.

60. Grover R., and Hance RJ. (1970), «Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine». Soil Sci., 109-138.

61. Boesten, J J.T.I, «Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system». Pest. Sci. 1990, 30, 31-41.

62. Boesten, J J.T.I. «Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106» Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.

63. Bastide J., Cantier J.M., et Coste C, (1980), «Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique». Weed Res. 21, 227-231.

64. Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), «Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments». J. Environ.QuaL, 10(3), 382-386.

65. Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), «Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water». Environ. Sci. Technol., 17(4), 227-231.

66. Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), «Sorption of organic substances by soils and sediments». J. Environm. Sci. Health, B19 (3), 297-312.

67. Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), «Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons». Chemosphere, 16(1), 109-116.

68. Lyman WJ., Reehl W.F.and Rosenblatt D.H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

69. Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). «Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota» in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), pp. 78- 115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

70. Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), «A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds». Science, Vol. 206, 831-832.

71. Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981), «Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption». Soil Sci. Soc. Am. J. 45, 38-42.

72. Karickhoff S.W., (1981), «Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils». Chemosphere, Vol. 10(8), 833-846.

73. Moreale A., van Bladel R., (1981), "Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité - reactivité. Revue de l'Agric, 34 (4), 319-322.

74. Millier M., Kôrdel W. (1996), «Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil». Chemosphere, 32(12), 2493-2504.

75. Kôrdel W., Kotthoff G., Millier M. (1995), «HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — results of a ring test». Chemosphere 30 (7), 1373-1384.

76. Kôrdel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), "HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — comparison of different stationary phases. Chemosphere 27 (12), 2341-2352.

77. Hance, R.J., (1967), «The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides». Weed Research, Vol. 7, pp. 29-36.

78. Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), «The retention processes: mechanisms» in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

79. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), «Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses», in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

80. Giles C.H., (1970), «Interpretation and use of sorption isotherms» in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, 14-32.

81. Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), «Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils». J. Chem. Soc, 3973-93.

82. Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980), «Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption». Ann. Agron. 31: 239-251.

83. Bedbur E., (1996), «Anomalies in the Freundlich equation», Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, U.K.

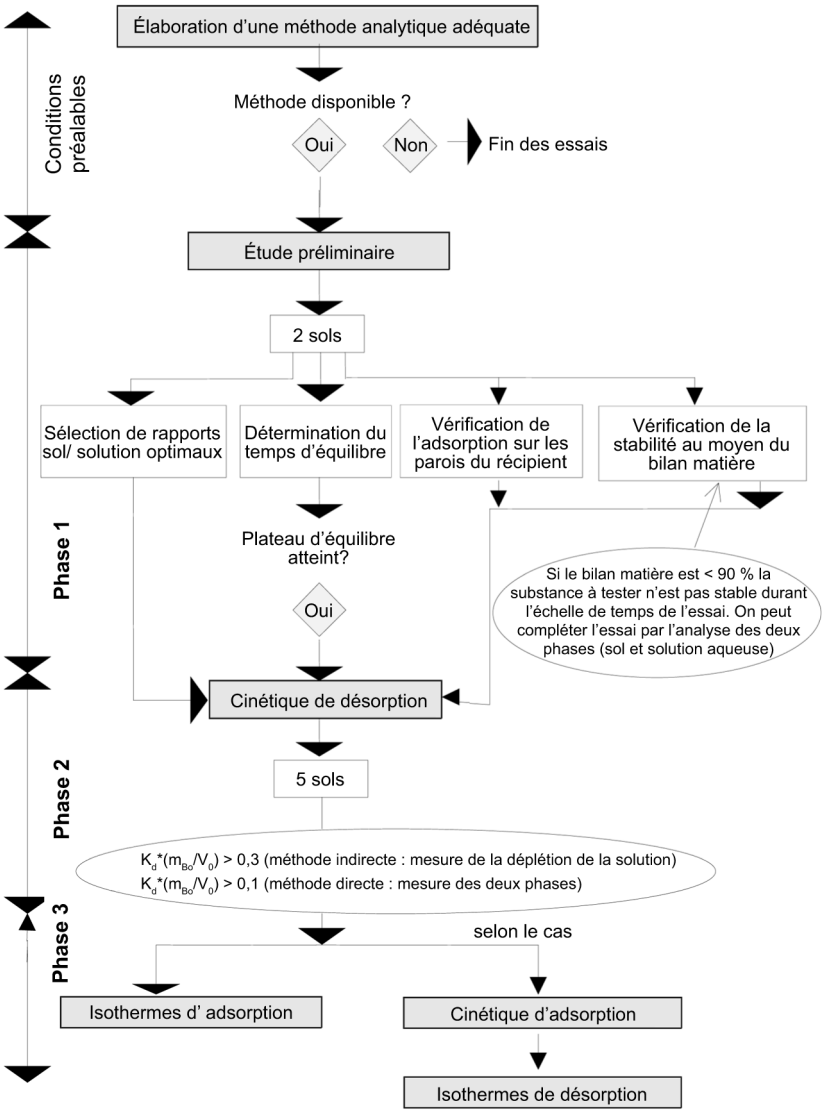
84. Guth, J.A., (1985), «Adsorption/desorption», in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

85. Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. 26:305 (1962).

▼B

Annexe 1

Organigramme d'essai



▼B

Appendice 2

LES EFFETS DE LA PRÉCISION DE LA MÉTHODE ANALYTIQUE ET DES VARIATIONS DE CONCENTRATION SUR LA PRÉCISION DES RÉSULTATS DE L'ADSORPTION

II ressort clairement du tableau suivant (84) que si la différence entre la masse initiale (m_0 = 110 µg) et la masse ($m_{aq}^{ads}(eq)$ = 100 µg) de la substance dans la solution à l'équilibre est très faible, une erreur de 5 % dans la mesure de la concentration à l'équilibre fausse de 50 % le calcul de la quantité de la substance adsorbée sur le sol ($m_s^{ads}(eq)$) et de 52,4 % le calcul de K_d.

Quantité de sol m_{sol} = 10g

Volume de solution V_0 = 100 cm^3

	$m_{aq}^{ads}(eq)$ (µg)	$C_{aq}^{ads}(eq)$ (µg cm^{-3})	R	$m_s^{ads}(eq)$* (µg)	$C_s^{ads}(eq)$* (µg g^{-1})	R‡	K_d (*)	R‡
	POUR A = 9 %							
m_0 = 110 µg ou C_0 = 1,100 µg/cm^3	100	1,000	valeur réelle	10	1,00	valeur réelle	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
	POUR A = 55 %							
m_0 = 110 µg ou C_0 = 1,100 µg/cm^3	50,0	0,500	valeur réelle	60,0	6,00	valeur réelle	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
	POUR A = 99 %							
m_0 = 110 µg ou C_0 = 1,100 µg/cm^3	1,100	0,011	valeur réelle	108,9	10,89	valeur réelle	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

(*) $m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq), C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right]V_0}{m_{soil}}$. $Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)}\frac{V_0}{m_{soil}}$

où:

$m_s^{ads}(eq)$ = est la masse de substance dans la phase de sol a l'équilibre (µg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = est la masse de substance dans la phase aqueuse à l'équilibre (µg);

$C_s^{ads}(eq)$ = est la concentration de substance dans la phase de sol à l'équilibre (µg g^{-1});

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = est la concentration massique de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre (µg cm^{-3});

R = est l'erreur analytique lors du calcul de $m_{aq}^{ads}(eq)$;

R‡ = est l'erreur calculée due à l'erreur analytique R.

▼B

Appendice 3

TECHNIQUES D'ESTIMATION DE K_d

1. Les techniques d'estimation permettent de prédire K_d en se fondant sur des corrélations avec des valeurs P_{ow} (12) (39) (63-68), avec des données sur l'hydrosolubilité (12) (19) (21) (39) (68-73) ou avec des données sur la polarité obtenues par HPLC en phase inversée (74-76). Comme le montrent les tableaux 1 et 2, on calcule K_{oc} ou K_{om} à partir de ces équations puis on obtient, indirectement, K_d à partir des équations suivantes:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc}(cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1{,}724} \cdot \frac{100}{\%oc}(cm^3 g^{-1})$$

2. Ces corrélations se fondent sur deux hypothèses: 1) c'est la matière organique du sol qui influence principalement l'adsorption d'une substance: 2) les interactions en jeu sont essentiellement non polaires. Il en résulte que ces corrélations: 1) ne sont pas applicables aux substances polaires, ou uniquement de manière limitée et: 2) qu'elles ne s'appliquent pas lorsque la teneur en matière organique du sol est très faible (12). Par ailleurs, si l'on a trouvé des corrélations satisfaisantes entre P_{ow} et l'adsorption (19), on ne peut pas en dire autant des relations entre l'hydrosolubilité et l'étendue de l'adsorption (19) (21); les études sont par conséquent très contradictoires.

3. Les tableaux 1 et 2 donnent quelques exemples de corrélations entre le coefficient d'adsorption et, respectivement, le coefficient de partage octanol-eau et l'hydrosolubilité.

Tableau 1

Exemples de corrélations entre le coefficient de distribution de l'adsorption et le coefficient de partage octanol-eau: pour d'autres exemples voir (12) (68)

Substances	Corrélations	Auteurs
Urée substituée	$\log K_{om} = 0{,}69 + 0{,}52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Substances aromatiques chlorées	$\log K_{oc} = - 0{,}779 + 0{,}904 \log P_{ow}$	Chiou et al. (1983) (65)
Divers pesticides	$\log K_{om} = 4{,}4 + 0{,}72 \log P_{ow}$	Gerstl et Mingelgrin (1984) (66)
Hydrocarbures aromatiques	$\log K_{oc} = - 2{,}53 + 1{,}15 \log P_{ow}$	Vowles et Mantoura (1987) (67)

Tableau 2

Exemples de corrélations entre le coefficient de distribution de l'adsorption et l'hydrosolubilité; pour d'autres exemples voir (68) (69)

Composés	Corrélations	Auteurs
Divers pesticides	$\log K_{om} = 3{,}8 - 0{,}561 \log S_w$	Gerstl et Mingelgrin (1984) (66)
Substances aliphatiques aromatiques chlorées	$^{lo}g\ K_{om} = (4{,}040 +/- 0{,}038) - (0{,}557 +/- 0{,}012) \log S_w$	Chiou et al. (1979) (70)
α-naphtol	$\log K_{oc} = 4{,}273 - 0{,}686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Substances cycliques aliphatiques chlorées	$\log K_{oc} = - 1{,}405 - 0{,}921 \log S_w - 0{,}00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Divers composés	$\log K_{om} = 2{,}75 - 0{,}45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

Appendice 4

CALCUL DES CONDITIONS DE CENTRIFUGATION

1. Le temps de centrifugation est donné par la formule suivante (on suppose que les particules sont sphériques):

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 rp^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right]\ln(R_b/R_t) \qquad (1)$$

Par commodité, tous les paramètres sont indiqués en unités n'appartenant pas au SI (g, cm)

où:

ω = vitesse de rotation (= 2 π rpm/60), rad s^{-1}

rpm = tours par minute;

η = viscosité de la solution, g s^{-1} cm^{-1}

r_p = rayon des particules, cm

p_s = densité du sol, g cm^{-3}

p_{aq} = densité de la solution, g cm^{-3}

R_t = distance entre le centre du rotor de la centrifugeuse et le haut de la solution dans le tube de la centrifugeuse, cm

R_b = distance entre le centre du rotor de la centrifugeuse et la base du tube de la centrifugeuse, cm

R_b-R_t = longueur du mélange sol/solution dans le tube de la centrifugeuse, cm

Dans la pratique, le double du temps calculé est nécessaire pour obtenir une séparation complète.

2. On peut simplifier l'équation (1) si l'on considère que la viscosité (η) et la densité (p_{aq}) de la solution sont égales à la viscosité et à la densité de l'eau à 25 °C; dans ce cas, η = 8,95 x 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1} et p_{aq} = 1,0 g cm^3.

Le temps de centrifugation est donné par l'équation 2:

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2.p^2(\rho_s - 1)}\ln\frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

3. L'équation 2 montre l'importance des paramètres du temps (t) et de la vitesse (rpm} pour définir les conditions de centrifugation permettant de séparer des particules d'une taille définie (c'est-à-dire d'un rayon de 0,1 µm dans notre cas): 1) la densité du sol et 2) la longueur du mélange dans le tube de la centrifugeuse (R_b-R_t), déterminent la distance qu'une particule de sol doit parcourir entre le haut de la solution et la base du tube; il apparaît que, pour un volume fixe, la longueur du mélange dans le tube dépend du carré du rayon du tube.

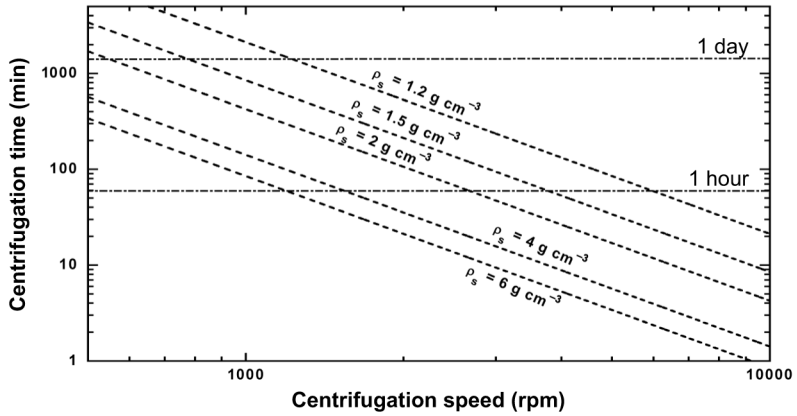
4. La figure 1 présente les différents temps de centrifugation (t) en fonction de la vitesse de centrifugation (rpm) pour différentes densités du sol (p_s) (figure la) et pour différentes longueurs du mélange dans les tubes de la centrifugeuse (figure 2a). La figure la montre nettement l'influence de la densité du sol. Pour une centrifugation classique de 3 000 rpm, le temps de centrifugation est d'environ 240 min pour une densité du sol de 1,2 g cm^1, alors qu'il n'est que de 50 min pour 2,0 g cm^3. La figure lb montre d'une manière similaire que, pour une centrifugation classique de 3 000 rpm, le temps de centrifugation est d'environ 50 min pour un mélange de 10 cm de long et de seulement 7 min pour une longueur de 1 cm. Il convient cependant de trouver un compromis optimal entre un mode de centrifugation exigeant le moins de longueur possible et la séparation commode des phases après la centrifugation.

▼B

5. De plus, lorsque l'on définit les conditions expérimentales de la séparation sol/solution, il importe de considérer l'existence d'une troisième «pseudo-phase», les colloïdes. Ces particules, d'une taille inférieure à 0,2 μm, peuvent influencer de manière significative le mécanisme d'adsorption d'une substance dans une suspension de sol. Après la centrifugation, réalisée comme cela est décrit ci-dessus, les colloïdes restent dans la phase aqueuse et sont analysés en même temps que celle-ci. On perd donc les informations sur leur impact.

   Si le laboratoire dispose d'équipements d'ultracentrifugation ou d'ultrafiltration, il peut étudier plus en détail l'adsorption/désorption d'une substance dans le sol et obtenir des informations sur l'adsorption de la substance sur les colloïdes. Il faut effectuer dans ce cas une ultracentrifugation à 60 000 rpm/min ou une ultrafiltration avec des filtres d'une porosité de 100 000 dalton pour séparer les trois phases, sol, colloïdes, solution. Le protocole d'essai doit être modifié en conséquence afin que les trois phases soient analysées.

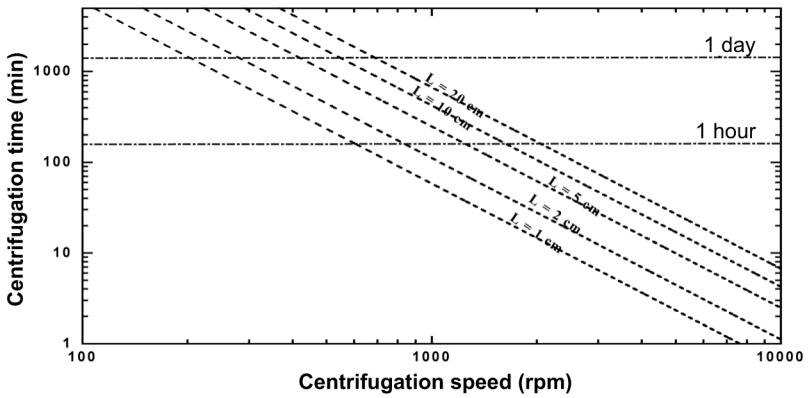
Fig. la.



Variation du temps de centrifugation (t) en fonction de la vitesse de centrifugation (rpm) et de la densité du sol.

(p_s). R_t = 10 cm, R_b-R_t = 10 cm, η = 8,95 x 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1} et p_{aq} = 1,0 g cm^{-3} à 25 °C.

Fig. lb.



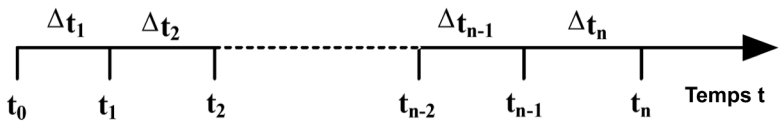
Variation du temps de centrifugation (t) en fonction de la vitesse de centrifugation (rpm) et de la longueur du mélange dans le tube de la centrifugeuse (R_b-R_t) = L; R_t = 10 cm, η = 8,95 x 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1}, p_{aq} = 1,0 g cm^{-3} à 25 °C et p_s = 2,0 g cm^3.

▼B

Appendice 5

CALCUL DE L'ADSORPTION A (%) ET DE LA DÉSORPTION D (%)

Organisation de l'essai dans le temps:



On suppose pour tous les calculs que la substance d'essai est stable et qu'elle n'adsorbe pas de manière significative sur les parois du récipient.

ADSORPTION A (A %)

a) *Méthode parallèle*

Le pourcentage d'adsorption est calculé pour chaque tube d'essai (i) au temps (t_i) selon l'équation suivante:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0}\% \qquad (1)\ (^1)$$

On peut calculer ainsi les termes de l'équation:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0\ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}{}^{ads}(t_i) \cdot V_0\ (\mu g) \qquad (3)$$

où

A_{ti} = pourcentage d'adsorption (%) au temps t_i

$m_s^{ads}(t_i)$ = masse de substance d'essai sur le sol au moment t_i où l'analyse est effectuée (µg)

m_0 = masse de la substance d'essai dans le tube au début de l'essai (µg)

C_o = concentration massique initiale de la solution en contact avec le sol (µg cm^{-3})

(1) Équation applicable à la méthode directe et indirecte. Toutes les autres équations s'appliquent uniquement à la méthode indirecte.

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = concentration massique de la substance dans la phase aqueuse au temps t_i où l'analyse est effectuée (µg cm $^{-3}$); cette concentration est déterminée par analyse en tenant compte des valeurs données par les témoins

V_O = volume initial de la solution en contact avec le sol (cm^3).

Les valeurs du pourcentage d'adsorption A_{t_i} ou $C_{aq}^{ads}(t_i)$ sont portées sur un graphe en fonction du temps, puis on détermine le temps mis pour atteindre l'équilibre de sorption (voir les figures 1 et 2).

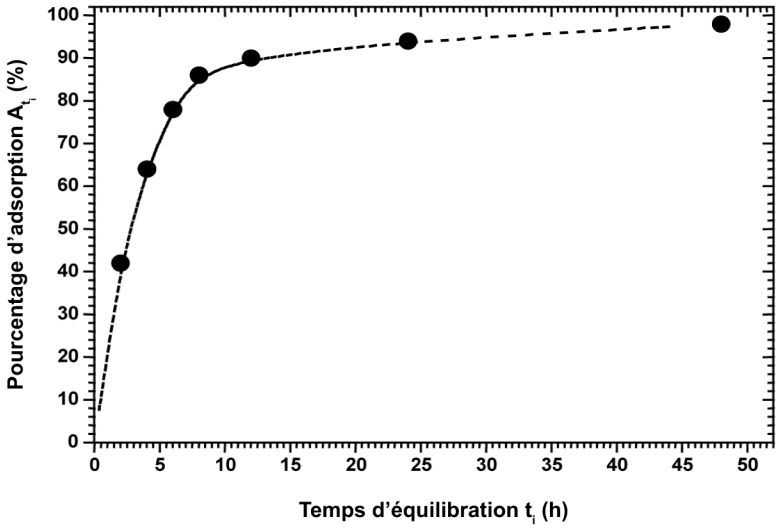


Figure 1.

Courbe de l'équilibre d'adsorption

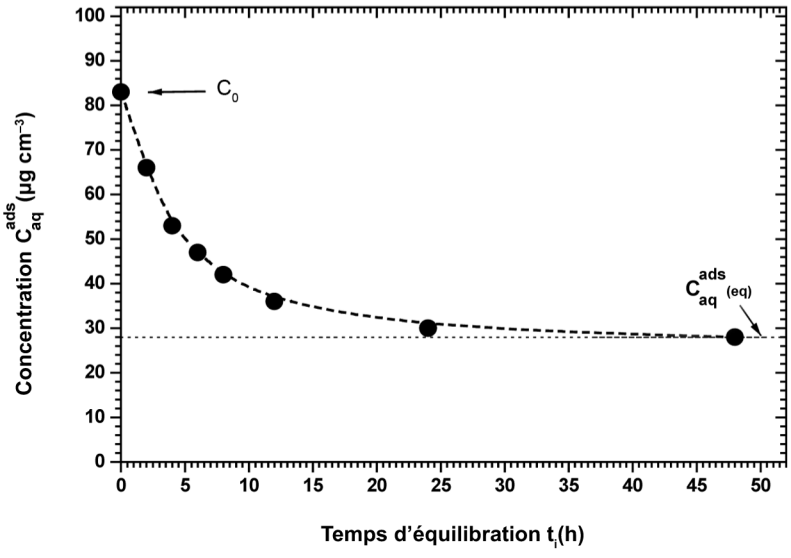


Figure 2.

Concentration massique de la substance d'essai dans la phase aqueuse (C_{aq}) en fonction du temps

▼B

b) *Méthode séquentielle*

Les équations suivantes tiennent compte du fait que le procédé d'adsorption s'opère en mesurant la substance d'essai dans de petites aliquotes de la phase aqueuse à des intervalles de temps précis.

— Durant chaque intervalle de temps, la quantité de substance adsorbée sur le sol est calculée comme suit:

— pour le premier intervalle de temps $\Delta t_i = t_i - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad (4)$$

— pour le deuxième intervalle de temps $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— pour le troisième intervalle de temps $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (6)$$

— pour le $n^{ième}$ intervalle de temps $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A)}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

— le pourcentage d'adsorption à chaque intervalle de temps $A_{\Delta t_i}$ est calculée selon l'équation suivante:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100 \ \ (\%) \quad (8)\ (1)$$

tandis que le pourcentage d'adsorption (A_{t_i}) au temps t_i est donné par l'équation:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} . 100 \ \ \% \quad (9)\ (1)$$

Les valeurs de l'adsorption A_{t_i} or $A_{\Delta t_i}$ (selon les besoins de l'étude) sont portées sur un graphe en fonction du temps, puis on détermine le temps mis pour atteindre l'équilibre de sorption.

— Au temps d'équilibre t_{eq}:

— la masse de substance adsorbée sur le sol est égale à:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)\ (1)$$

(1) Équations applicables à la méthode directe et indirecte. Toutes les autres équations s'appliquent uniquement à la méthode indirecte.

▼B

— la masse de substance dans la soulution est égale à:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)\ (^1)$$

— et le pourcentage d'adsorption à l'équilibre est égal à:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)\ (^1)$$

Les paramètres ci-dessus sont définis de la manière suivante:

$m_s^{ads}(\Delta t_1)$, $m_s^{ads}(\Delta t_2)$, ..., $m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = masse de substance adsorbée sur le sol durant les intervalles de temps Δt_1. Δt_2,..., Δt_n (µg)

$m_m^{ads}(t_1)$, $m_m^{ads}(t_2)$, ..., $m_n^{ads}(t_n)$ = masse de substance mesurée dans une aliquote $V_a{}^A$ au temps t_1, t_2, ..., t_n (µg)

$m_s^{ads}(eq)$ = masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption (µg)

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masse de substance dans la solution à l'équilibre d'adsorption (µg)

$V_a{}^A$ = volume de l'aliquote dans laquelle la substance est mesurée (cm^3)

$A_{\Delta ti}$ = pourcentage d'adsorption correspondant à l'intervalle de temps Δt_i (%)

A_{eq} = pourcentage d'adsorption à l'équilibre d'adsorption (%).

DÉSORPTION D (%)

Le temps t_0 qui marque le début de l'essai de cinétique de désorption correspond au moment où le volume maximal de substance récupérée (une fois que l'équilibre d'adsorption a été atteint) est remplacé par un volume égal de solution de $CaCl_2$0,01 M.

a) *Méthode parallèle*

Au temps t_i, on mesure la concentration massique de la substance dans la phase aqueuse prélevée dans le tube i (V_r^i) et la masse désorbée est calculée selon l'équation suivante:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{v_r^i}\right) - m_{aq}^{A} \quad (13)$$

À l'équilibre de désorption t_i — t_{eq} de sorte que $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

La masse de substance désorbée durant l'intervalle de temps (Δt_i) est donnée par l'équation suivante:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Le pourcentage de désorption est calculé comme suit:

au temps t_i avec l'équation:

(1) Équation applicable à la méthode directe et indirecte. Toutes les autres équations s'appliquent uniquement à la méthode indirecte.

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \qquad (15)$$

durant l'intervalle de temps (Δt_i) avec l'équation:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \qquad (16)$$

où:

D_{ti} = pourcentage de désorption au temps t_i (%)

$D_{\Delta ti}$ = pourcentage de désorption à l'intervalle de temps Δt_i (%)

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = masse de substance désorbée au temps t_i, (µg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = masse de substance désorbée durant l'intervalle de temps Δt_i (µg)

$m_m^{des}(t_i)$ = masse de substance mesurée par analyse au temps t_i dans un volume de solution V_r^i prélevé pour l'analyse (µg);

$m_{aq}{}^{A}$ = masse de substance subsistant après l'équilibre d'adsorption en raison d'un volume de remplacement insuffisant (µg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \qquad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masse de substance dans la solution à l'équilibre d'adsorption (µg)

V_R = volume de surnageant prélevé du tube après obtention de l'équilibre d'adsorption et remplacé par un volume égal de solution de $CaCl_2$0,01 M (cm^3)

V_r^i = volume de solution prélevé du tube (i) afin de mesurer la substance lors de l'essai de cinétique de désorption (cm^3).

Les valeurs de désorption D_{ti} ou $D_{\Delta t_i}$ (selon les besoins de l'étude) sont portées sur un graphe en fonction du temps, puis on calcule le temps mis pour atteindre l'équilibre de désorption.

b) *Méthode séquentielle*

Les équations ci-après tiennent compte du fait que le procédé d'adsorption a été réalisé en mesurant la substance d'assai dans de petites aliquotes ((v_a^A)) de la phase aqueuse (voir le chapitre sur la méthode séquentielle au point 1.9 «Réalisation de l'essai»). On suppose a) que le volume de surnageant prélevé du tube après l'essai de cinétique d'adsorption a été remplacé par un volume égal de solution de $CaCl_2$0,01 M (V_R) et b) que le volume total de la phase aqueuse en contact avec le sol (V_T) durant l'essai de cinétique de désorption reste constant et égal à l'équation suivante:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \qquad (18)$$

▼B

Au temps t_i:

— La masse de substance est mesurée dans une petite aliquote (v_a^D) et la masse désorbée est calculée selon l'équation suivante:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— À l'équilibre de désorption $t_i = t_{eq}$ de sorte que $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

— Le pourcentage de désorption D_{t_i} est calculé selon l'équation suivante:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \ (\%) \quad (20)$$

À l'intervalle de temps (Δt_i):

La quantité de substance désorbée durant chaque intervalle de temps est calculée de la manière suivante:

— pour le premier intervalle de temps $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \text{ and } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— pour le deuxième intervalle de temps $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right)$$

et

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right] \quad (22)$$

— pour le nième intervalle de temps $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1,n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{\left(V_T - (n-i) \cdot v_a^D\right)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right] \quad (23)$$

et

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1,n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$$

Enfin, le pourcentage de désorption à chaque intervalle de temps $D_{\Delta t_i}$ est calculé au moyen de l'équation suivante:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \ (\%) \quad (24)$$

tandis que le pourcentage de désorption D_{t_i} à un moment t_i est donné par l'équation ci-dessous:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \ (\%) \quad (25)$$

▼B

Les paramètres ci-dessus sont définis de la manière suivante:

$m^{des}{}_s(\Delta t_1)$, $m^{des}{}_s(\Delta t_2)$,... , $m^{des}{}_s(\Delta t_n)$ = masse de substance restant adsorbée sur le sol après les intervalles de temps Δt_1, Δt_2, ..., Δt_n (µg)

$m^{des}{}_{aq}(\Delta t_1)$, $m^{des}{}_{aq}(\Delta t_2)$,... , $m^{des}{}_{aq}(\Delta t_n)$ = masse de substance désorbée durant les intervalles de temps Δt_1, $\Delta\ t_2$, …, Δt_n (µg)

$m^{des}{}_m(t_1)$, $m^{des}{}_m(t_2)$,... , $m^{des}{}_m(t_n)$ = masse de substance mesurée dans une aliquote ($v^D{}_a$) au temps t_1, t_2, …, t_n, (µg);

V_T = volume total de la phase aqueuse en contact avec le sol durant l'essai de cinétique de désorption réalisé avec la méthode séquentielle (cm^3)

$m^A{}_{aq}$ = masse de substance subsistant après l'équilibre d'adsorption en raison d'un volume de remplacement insuffisant (µg);

$$m^A_{aq} = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v^A_a(i) \right) - V_R}{V_0 - \sum_{i=1}^{n} v^A_a(i)} \right) \cdot m^{ads}_{aq}(eq) \qquad (26)$$

où:

V_R = volume de surnageant extrait du tube après l'obtention de l'équilibre d'adsorption et remplacé par un volume égale de solution de $CaCl_2$0,01 M (cm^3)

v^D_a = volume d'aliquote extrait du tube (i) pour analyse durant l'essai de cinétique de désorption réalisé avec la méthode séquentielle (cm^3)

$$v^D_a \leq 0{,}02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

Appendice 6

ADSORPTION-DÉSORPTION DANS LES SOLS: PRÉSENTATION DES DONNÉES (FORMULAIRES)

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C, 12 h): ..... %

Température: ..... °C

Adéquation de la méthode analytique

Poids du sol	g	
Sol: matière sèche	g	
Volume de la solution de $CaCl_2$	cm^3	
Concentration nominale de la solution finale	$\mu g\ cm^{-3}$	
Concentration d'analyse de la solution finale	$\mu g\ cm^{-3}$	

Méthode analytique utilisée:

Calibration de la méthode analytique:

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C, 12 h): ..... %

Température: ..... °C

Méthode analytique utilisée: Indirecte ☐ Parallèle ☐ Séquentielle ☐

Directe ☐

Essai d'adsorption: échantillons d'essai

	Symbole	Unités	Temps d'équilibrage		Temps d'équilibrage		Temps d'équilibrage		Temps d'équilibrage	
Tube n°										
Poids du sol	—	g								
Sol: matière sèche	m_{sol}	g								
Volume d'eau dans le sol pesé (calculé)	V_{ws}	cm^3								
Volume de $CaCl_2$ 0,01 M pour équilibrer le sol		cm^3								
Volume de solution de réserve		cm^3								
Volume total de phase aqueuse en contact avec le sol	V_0	cm^3								
Concentration initiale de la solution à tester	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Masse de substance au début de l'essai	m_0	µg								

▼B

	Symbole	Unités	Temps d'équilibrage		Temps d'équilibrage		Temps d'équilibrage		Temps d'équilibrage	
Après agitation et centrifugation										
MÉTHODE INDIRECTE										
Méthode parallèle										
Concentration de la substance dans la phase aqueuse, correction témoins incluse	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm^{-3}								
Méthode séquentielle										
Masse de substance mesurée dans l'aliquote V_a [A]	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
MÉTHODE DIRECTE										
Masse de substance adsorbée sur le sol	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Calcul de l'adsorption										
Adsorption	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Moyennes										
Coefficient d'adsorption	K_d	cm^3 g^{-1}								
Moyennes										
Coefficient d'adsorption	K_{oc}	cm^3 g^{-1}								
Moyennes										

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C, 12 h): ..... %

Température: ..... °C

Essai d'adsorption: témoins et contrôles

	Symbole	Unités	Témoin		Témoin		Contrôle	
Tube n°								
Poids du sol		g					0	0
Volume d'eau dans le sol pesé (calculé)		cm^3					—	—
Volume de solution de $CaCl_2$ 0,01 M ajouté		cm^3						
Volume ajouté de solution de réserve de la substance		cm^3	0	0				
Volume total de la phase aqueuse (calculé)		cm^3					—	—

▼B

	Symbole	Unités	Témoin		Témoin		Contrôle	
Concentration initiale de la substance dans la phase aqueuse		µg cm^{-3}						
Après agitation et centrifugation								
Concentration dans la phase aqueuse		µg cm^{-3}						

Remarque: ajouter des colonnes si nécessaire.

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C, 12 h): ..... %

Température: ..... °C

Bilan matière

	Symbole	Unités				
Tube n°						
Poids du sol	—	g				
Sol: matière sèche	m_{sol}	g				
Volume d'eau dans le sol pesé (calculé)	V_{ws}	ml				
Volume de $CaCl_2$ 0,01 M pour équilibrer le sol		ml				
Volume de solution de réserve		cm^3				
Volume total de phase aqueuse en contact avec le sol	V_0	cm^3				
Concentration initiale de la solution à tester	C_0	µg cm^{-3}				
Temps d'équilibrage	—	h				
Après agitation et centrifugation						
Concentration de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption, correction témoin incluse	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}				
Temps d'équilibrage	t_{eq}	h				
1re dilution au solvant						
Volume extrait de phase aqueuse	V_{rec}	cm^3				
Volume ajouté de solvant	ΔV	cm^3				
1re extraction au solvant						
Signal analysé dans le solvant	S_{E1}	var.				
Concentration de substance dans le solvant	C_{E1}	µg cm^{-3}				

▼B

	Symbole	Unités				
Masse de substance extraite du sol et des parois du récipient	m_{E1}	µg				
2e dilution au solvant						
Volume de solvant extrait	ΔV_S	cm^3				
Volume de solvant ajouté	$\Delta V'$	cm^3				
2e extraction au solvant						
Signal analysé dans le solvant	S_{E2}	var.				
Concentration de substance dans le solvant	C_{E2}	µg cm^{-3}				
Masse de substance extraite du sol et des parois lu récipient	m_{E2}	µg				
Masse totale de substance: extraction en deux tapes	m_E	µg				
Bilan matière	MB	%				

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C, 12 h): ..... %

Température: ..... °C

Isothermes d'adsorption

	Symbole	Unités								
Tube n°										
Poids du sol	—	g								
Sol: matière sèche	E	g								
Volume d'eau dans le sol pesé (calculé)	V_{WS}	cm^3								
Volume de $CaCl_2$ 0,01 M pour équilibrer le sol		cm^3								
Volume de solution de réserve ajouté		cm^3								
Volume total de phase aqueuse en contact avec le sol (calculé)	V_0	cm^3								
Concentration de la solution	C_0	µg cm^{-3}								
Temps d'équilibrage	—	h								

▼B

	Symbole	Unités								
Après agitation et centrifugation										
Concentration de la substance dans la phase aqueuse, correction témoin incluse	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
Température		°C								
Masse adsorbée par unité de sol	$C_s^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

Analyse de régression:

valeur de K_F^{ads}:

valeur de l/n:

coefficient de régression r^2:

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C 12 h): ..... %

Température: ..... °C

Méthode analytique utilisée: Indirecte ☐ Parallèle ☐ Séquentielle ☐

Essai de désorption

		Symbole	Unités	Intervalle de temps	Intervalle de temps	Intervalle de temps	Intervalle de temps
Tube n° provenant de l'essai d'adsorption							
Masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption		$m_s^{ads}(eq)$	µg				
Volume extrait de phase aqueuse remplacé par $CaCl_2$ 0,01 M		V_R	cm^3				
Volume total de phase aqueuse en contact avec le sol	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
Masse de substance restant après l'équilibre d'adsorption en raison d'un volume de remplacement insuffisant		m_{aq}^A	µg				
Cinétique de désorption							
Masse mesurée de substance désorbée du sol au temps t_i		$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Volume de solution extrait du tube (i) afin	PM	V_f^i	cm^3				
	SM	V_a^D	cm^3				
Masse de substance désorbée du sol du sol au temps t_i (calculé)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Masse de substance désorbée du sol durant l'intervalle de temps Δt_i (calculé)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Symbole	Unités	Intervalle de temps	Intervalle de temps	Intervalle de temps	Intervalle de temps
Pourcentage de désorption						
Désorption au temps t_i	D_{t_i}	%				
Désorption à l'intervalle de temps Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Coefficient de désorption apparente	K_{des}					

PM: Méthode parallèle.

SM: Méthode séquentielle.

▼B

C.19. ESTIMATION DU COEFFICIENT D'ADSORPTION (K_{OC}) SUR LE SOL ET LES BOUES D'ÉPURATION PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

1. MÉTHODE

La méthode décrite reprend la ligne directrice n° 121 de l'OCDE (2001).

1.1. INTRODUCTION

On peut décrire le comportement de sorption des substances dans les sols ou les boues d'épuration à l'aide de paramètres déterminés expérimentalement selon la méthode d'essai C18. Un des paramètres essentiels est le coefficient d'adsorption, défini comme le rapport entre la concentration d'une substance dans le sol ou les boues et sa concentration dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption. Le coefficient d'adsorption normalisé basé sur la teneur en carbone organique du sol (K_{oc}) est un bon indicateur de la capacité de liaison d'une substance chimique à la matière organique du sol ou des boues d'épuration, et permet de comparer les substances chimiques entre elles. On peut estimer ce paramètre à partir de corrélations entre la solubilité dans l'eau et le coefficient de partage n-octanol/eau (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

La méthode expérimentale décrite dans cet essai utilise la HPLC pour estimer le coefficient d'adsorption K_{oc} dans le sol ou les boues d'épuration (8). Elle donne des résultats beaucoup plus fiables que ceux obtenus par les calculs de la méthode QSAR (9). En tant que méthode d'estimation, elle ne peut pas être totalement substituée aux essais par agitation conduits dans le cadre de la méthode d'essai C.18. Toutefois, le K_{oc} estimé peut servir à sélectionner des paramètres d'essai pertinents pour l'étude des processus d'adsorption/désorption suivant la méthode précitée, grâce au calcul du coefficient de distribution (K_d) ou du coefficient d'adsorption de Freundlich (K_f) selon l'équation 3 (voir paragraphe 1.2).

1.2. DÉFINITIONS

K_d est le coefficient de distribution défini comme le rapport des concentrations à l'équilibre (C) d'une substance d'essai dissoute dans un système à deux phases dont une sorbante (sol ou boues d'épuration) et l'autre aqueuse. Il est sans unité lorsque les concentrations dans les deux phases sont exprimées en termes de poids par poids. Si la concentration dans la phase aqueuse est exprimée en poids par volume, les unités sont alors en ml· g^{-1}. K_d est susceptible de varier en fonction des propriétés du sorbant et peut dépendre de la concentration.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \; or \; \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \qquad (1)$$

où:

C_{soil} = est la concentration de la substance d'essai dans le sol à l'équilibre d'adsorption (µg· g^{-1});

C_{slud} = est la concentration de la substance d'essai dans les boues à l'équilibre d'adsorption (µg· g^{-1});

C_{aq} = est la concentration de la substance d'essai dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption (µg· g^{-1}, µg· ml^{-1}).

▼B

K_f est le coefficient d'adsorption de Freundlich, défini comme la concentration de la substance d'essai dans le sol ou les boues d'épuration (x/m) lorsque la concentration à l'équilibre (C_{aq}) dans la phase aqueuse est égale à un. Il est exprimé en $\mu g.g^{-1}$ de sorbant. Il se calcule selon l'équation suivante.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

où:

x/m = est la quantité de sorbant;

1/n = est la pente de l'isotherme d'adsorption de Freundlich;

C_{aq} = est la concentration de la substance d'essai dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption (µg . ml- [1]).

Lorsque $C_{aq} = 1;\ \log K_f = \log \frac{x}{m}$

K_{oc} est le coefficient de distribution (K_d) ou le coefficient d'adsorption de Freundlich (K_f) normalisé basé sur la teneur en carbone organique (f_{oc}) du sorbant. Plus particulièrement dans le cas des substances non ionisées, il donne une approximation du degré d'adsorption d'une substance sur le sorbant et permet de faire des comparaisons entre différents produits chimiques. Dépendant de K_d et de K_f, il peut être sans unité ou s'exprimer en ml . g^{-1} ou en µg . g^{-1} de matière organique.

$$Koc = \frac{Kd}{foc}\ (\text{sans unité ou en ml} \cdot g^{-1}) \text{ou } \frac{Kf}{foc}\ (\mu g \cdot g^{-1}) \quad (3)$$

Comme la relation entre K_{oc} et K_d n'est pas toujours linéaire, les valeurs de K_{oc} peuvent donc varier d'un sol à l'autre, mais leur variabilité est très réduite par rapport aux valeurs de K_d ou de K_f.

Le coefficient d'adsorption (K_{oc}) se déduit du facteur de capacité (k') à partir de la courbe d'étalonnage de log k' en fonction de log K_{oc}, tracée pour les composés de référence sélectionnés. L'équation est la suivante:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

où:

t_R = est le temps de rétention de la substance d'essai et de la substance de référence dans la colonne de HPLC (en minutes)

t_0 = est le temps mort dans la colonne de HPLC (en minutes) (voir point 1.8.2).

P_{ow} est le coefficient de partage octanol/eau. défini comme le rapport des concentrations d'une substance dissoute dans l'eau et le n-octanol. Il est sans dimension.

$$Pow = \frac{Coctanol}{Caq}\ (= Kow) \quad (5)$$

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Avant d'utiliser cette méthode, il convient de connaître la formule développée, la pureté et, le cas échéant, la constante de dissociation des substances de référence. Il est également utile d'être renseigné sur leur solubilité dans l'eau et les solvants organiques, leur coefficient de partage octanol/eau ainsi que sur leurs caractéristiques d'hydrolyse.

▼B

Pour établir la corrélation entre les résultats expérimentaux de rétention en HPLC d'une substance d'essai et son coefficient d'adsorption K_{oc}, on doit tracer la courbe d'étalonnage de log K_{oc} en fonction de log k'. Il faudrait utiliser au minimum six points dont au moins un supérieur et un inférieur à la valeur supposée de la substance d'essai. La précision de la méthode sera d'autant plus grande que les substances de référence employées présenteront une structure chimique analogue à celle de la substance d'essai. S'il n'est pas possible d'avoir ces données, l'utilisateur est libre de sélectionner les substances d'étalonnage les mieux adaptées. Il devrait alors opter pour une série plus générale de substances présentant une hétérogénéité de structure. Les substances et les valeurs de K_{oc} recommandées à l'usage sont indiquées en annexe, au tableau 1 pour les boues d'épuration et au tableau 3 pour les sols. Il y aura donc lieu de justifier le choix de toute autre substance d'étalonnage.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La HPLC est réalisée sur des colonnes d'analyse dont la phase solide est composée de résines commerciales cyanopropyliques contenant des radicaux lipophiles et polaires. On utilise une phase stationnaire modérément polaire basée sur une matrice de silice:

– O – Si	– CH_2 — CH_2 — CH_2	– CN
silice	espaceur apolaire	radical polaire

Le principe de cette méthode d'essai est analogue à celui de la méthode d'essai A.8 (coefficient de partage, méthode par HPLC). La substance d'essai, en migrant dans la colonne contenant la phase mobile, interagit avec la phase stationnaire. La répartition de la substance entre la phase mobile et la phase stationnaire contribue à en ralentir la progression. La composition de la phase stationnaire qui comporte à la fois des sites polaires et apolaires fait qu'une interaction est possible entre groupements polaires et radicaux apolaires d'une molécule — à l'instar de la matière organique dans des matrices de sol ou de boues d'épuration. On peut ainsi établir une relation entre le temps de rétention sur la colonne et le coefficient d'adsorption sur la matière organique.

Le pH exerce une influence significative, en particulier, sur le comportement de sorption des substances polaires. En règle générale, le pH varie entre 5,5 et 7,5 dans les sols agricoles et les bassins des stations de traitement des eaux usées. Les substances ionisables devraient être testées deux fois dans des solutions tampons appropriées, à savoir sous leur forme ionisée et non ionisée, mais seulement si la dissociation du composé chimique atteint au moins 10 %, à des valeurs de pH comprises entre 5,5 et 7,5.

Comme l'évaluation se fonde exclusivement sur la relation entre la rétention sur la colonne de HPLC et le coefficient d'adsorption, il est inutile de faire appel à une méthode d'analyse quantitative, car seule la détermination du temps de rétention est nécessaire. À condition de disposer d'une série de substances de référence appropriées et d'appliquer des conditions expérimentales normalisées, cette méthode constitue un moyen rapide et efficace d'estimer le coefficient d'adsorption K_{oc}.

1.5. APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

La méthode par HPLC convient aux substances chimiques (marquées ou non) pour lesquelles il existe un système de détection approprié (spectrophotomètre ou détecteur de radioactivité, par exemple) et qui restent suffisamment stables tout au long de l'essai. Elle peut s'avérer particulièrement utile pour les substances difficiles à étudier dans d'autres systèmes expérimentaux (à savoir, les substances volatiles, les substances insolubles dans l'eau à une concentration mesurable par analyse et les substances présentant une très grande affinité avec la surface des récipients d'incubation). On peut également l'appliquer à des mélanges qui donnent des bandes d'élution non résolues. Dans ce cas, il faut déterminer les valeurs limites supérieures et inférieures du log K_{oc} des composants du mélange d'essai.

▼B

Les impuretés risquent parfois de compliquer l'interprétation des résultats de la HPLC, mais leur importance restera négligeable si la substance d'essai peut être clairement identifiée et séparée des impuretés par une méthode analytique.

Après avoir été validée pour les substances énumérées au tableau 1 de l'appendice, cette méthode a été appliquée à toute une série d'autres composés chimiques répertoriés dans les classes chimiques suivantes:

— amines aromatiques (exemples: trifluraline, 4-chloroaniline, 3,5-dinitro-aniline, 4-méthylaniline, N-méthvl- aniline, 1-naphthylamine),

— esters d'acides carboxyliques aromatiques (exemples: ester méthylique de l'acide benzoïque, 3,5-dinitroben- zoate d'éthyle),

— hydrocarbures aromatiques (exemples: toluène, xylène, éthylbenzène, nitrobenzène),

— esters de l'acide aryloxyphénoxypropionique (exemples: didofop-méthyle, fénoxaprop-éthyle, fénoxaprop- P-éthyle).

— fongicides à base de benzimidazole ou d'imidazole (exemples: carbendazime, fubéridazole, triazoxyde),

— amides de l'acide carboxilique (exemples: 2-chlorobenzamide, N,N-diméthylbenzamide, 3,5-dinitrobenzamide, N-méthylbenzamide, 2-nitrobenzamide, 3-nitrobenzamide),

— hydrocarbures chlorés (exemples: endosulfan, DDT, hexachlorobenzène, quintozène, 1,2,3-trichlorobenzène),

— insecticides organo-phosphorés (exemples: azinphos-méthyle, disulfoton, phénamiphos, isophenphos, pyrazophos, sulprophos, triazophos),

— phénols (exemples: phénol, 2-nitrophénol, 4-nitrophénol, pentachlorophénol, trichloro-2,4,6-phénol, 1-naphtol),

— dérivés de la phénylurée (exemples: isoproturon, monolinuron, pencycuron),

— colorants pigmentaires (exemples: Acid yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81),

— hydrocarbures aromatiques polycycliques (exemples: acénaphthène, naphthalène),

— herbicides à base de triazine-1,3,5 (exemples: prométryne, propazine, simazine, terbutryne),

— dérivés de triazole (exemples: tébuconazole, triadiméfon, tradiménol, triapenthénol).

Cette méthode ne convient pas aux substances réagissant avec l'éluant ou la phase stationnaire. Par ailleurs, elle n'est pas applicable aux substances qui interagissent de manière spécifique avec des constituants inorganiques (formation de complexes en grappe avec les minéraux argileux, par exemple). Elle risque d'être inopérante pour les produits tensio-actifs, les substances inorganiques ainsi que les acides et bases modérés à forts. Elle permet de déterminer des valeurs de log K_{oc} comprises entre 1,5 et 5,0. Les substances ionisantes doivent être mesurées dans une phase mobile tamponnée, en prenant toutes les précautions nécessaires pour éviter la précipitation des composants du tampon ou de la substance d'essai.

▼B

1.6. CRITÈRES DE QUALITÉ

1.6.1. **Précision**

En règle générale, le coefficient d'adsorption d'une substance d'essai peut être estimé à ± 0,5 unité logarithmiques de la valeur déterminée d'après la méthode par agitation (voir au tableau 1 de l'appendice). Il est possible d'atteindre une plus grande précision si les substances de référence utilisées présentent une structure chimique analogue à celle de la substance d'essai.

1.6.2. **Répétabilité**

Toutes les analyses doivent être répétées au moins deux fois. Les valeurs du log K_{oc} calculées à partir de résultats expérimentaux doivent être comprises dans un intervalle de 0,25 unité log.

1.6.3. **Reproductibilité**

L'expérience acquise jusqu'à présent en appliquant la méthode d'essai par HPLC vient en corroborer la validité. À l'issue d'une étude expérimentant 48 substances (en majorité des pesticides) pour lesquelles existaient des données fiables concernant le K_{oc} sur des sols, on a obtenu un coefficient de corrélation: R = 0,95 (10) (11).

Un essai comparatif interlaboratoires conduit par 11 laboratoires a permis d'améliorer et de valider la méthode (12). Tous les résultats sont reproduits au tableau 2 de l'appendice.

1.7. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.7.1. **Estimation préliminaire du coefficient d'adsorption**

Le coefficient de partage octanol/eau P_{ow} (= K_{ow}) et, dans une certaine mesure, l'hydrosolubilité peuvent servir d'indicateurs du degré d'adsorption, en particulier, pour les substances non ionisées. Ils permettent donc une première approximation des ordres de grandeur. Une série de corrélations utiles ont été publiées concernant plusieurs classes de produits chimiques (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. **Appareillage**

L'appareillage doit nécessairement comprendre un chromatographe en phase liquide équipé d'une pompe sans pulsations et d'un système de détection adapté. Il est recommandé d'utiliser une boucle d'injection munie d'une valve d'injection. Il faut employer des résines commerciales cyanopropyliques liées chimiquement sur une base de silice (Hypersil ou Zorbax CN, par exemple). Une colonne de garde du même matériau peut être insérée entre le système d'injection et la colonne d'analyse. La puissance de séparation des colonnes d'analyse est susceptible de varier énormément d'un fournisseur à l'autre. À titre indicatif, il faudrait atteindre les facteurs de capacité (k') suivants: log k' > 0,0 pour log K_{oc} = 3,0 et log k' > — 0,4 pour log K_{oc} = 2,0, en utilisant une phase mobile méthanol/eau 55/45 %.

1.7.3. **Phases mobiles**

Après avoir testé différentes phases mobiles, on recommande les deux suivantes:

— méthanol/eau (55/45 % v/v),

— méthanol/solution tampon de citrate 0,01 M à pH 6,0 (55/45 % v/v).

▼B

Le solvant d'élution est préparé à partir de méthanol de qualité HPLC et d'eau distillée ou d'un tampon citrate. Le mélange est dégazé avant emploi. Il est préférable d'effectuer une élution isocratique. Si les mélanges méthanol/eau sont contre-indiqués, on peut essayer d'autres mélanges de solvant organique/eau, à savoir éthanol/eau ou acétonitrile/eau. Dans le cas de composés ionisants, il est recommandé d'utiliser une solution tampon afin de stabiliser le pH. Il faut veiller à éviter que les sels ne précipitent ou que la colonne ne se détériore, ce qui risque de se produire avec certains mélanges de phase organique/tampon.

On s'abstiendra d'utiliser des additifs tels que des réactifs à paires d'ions, car ils risquent d'affecter les propriétés sorbantes de la phase stationnaire. Vu que des modifications de cette nature dans la phase stationnaire risquent d'être irréversibles, il est impératif d'effectuer les analyses comportant ce type d'additifs sur des colonnes séparées.

1.7.4. **Solutés**

Les substances de référence et d'essai doivent être dissoutes dans la phase mobile.

1.8. RÉALISATION DE L'ESSAI

1.8.1. **Conditions expérimentales**

On doit enregistrer la température pendant les mesures. Il est fortement recommandé d'utiliser une colonne placée dans une enceinte thermorégulée afin de garantir des conditions de température constantes pendant les différents cycles d'étalonnage et d'évaluation et la mesure de la substance d'essai.

1.8.2. **Détermination du temps mort t_o**

On peut utiliser deux méthodes pour déterminer le temps mort t_o (voir également point 1.2).

1.8.2.1. *Détermination du temps mon t_o au moyen d'une série homologue*

Cette procédure a montré qu'il est possible d'obtenir des valeurs de t_o harmonisées et fiables. Pour sa description, il faut se reporter à la méthode d'essai A.8 «Coefficient de partage n-octanol/eau et méthode d'analyse par HPLC».

1.8.2.2. *Détermination du temps mort t_o par des substances inertes non retenues sur la colonne*

Cette technique met en jeu l'injection de solutions de formamide, d'urée ou de nitrate de sodium. Il convient de répéter les mesures au moins deux fois.

1.8.3. **Détermination des temps de rétention t_R**

Les substances de référence doivent être sélectionnées selon les indications du point 1.3. Pour déterminer leur temps de rétention, on peut les injecter sous la forme d'un étalon composite, à condition d'avoir vérifié au préalable que le temps de rétention de chaque étalon n'est pas influencé par la présence des autres étalons de référence. Il faudrait procéder à un étalonnage à intervalles réguliers, au moins deux fois par jour, pour tenir compte de toute variation imprévue dans le fonctionnement de la colonne. Pour la bonne règle, il est préférable d'injecter les étalons avant et après la substance d'essai pour s'assurer que les temps de rétention n'ont pas évolué. On injecte chaque substance d'essai séparément dans des proportions aussi faibles que possible (ce qui évite de surcharger la colonne}, puis on détermine son temps de rétention.

▼B

Afin d'accroître la fiabilité des mesures, toutes les déterminations doivent être effectuées au moins en double. Les valeurs de log K_{oc} déduites des résultats expérimentaux doivent être comprises dans un intervalle de 0,25 unité log.

1.8.4. **Évaluation**

Les facteurs de capacité k' sont calculés à partir du temps mort t_o et des temps de rétention t_R des substances de référence selon l'équation 4 (voir point 1.2). Les valeurs de log k' des substances de référence sont ensuite portées sur une courbe graphique en fonction des valeurs de leur log K_{oc} extraites des essais par agitation dont les résultats figurent aux tableaux 1 et 3 de l'appendice. À l'aide de cette courbe, la valeur du log K_{oc} d'une substance d'essai est calculée à partir de son log k'. Si les résultats expérimentaux montrent que le log K_{oc} de la substance sort de l'intervalle des valeurs d'étalonnage, il convient de recommencer l'essai en employant d'autres substances de référence plus appropriées.

2. **PRÉSENTATION DES DONNÉES**

Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes:

— identité, degré de pureté et. le cas échéant, valeurs de pK_d des substances d'essai et de référence.

— description des matériels utilisés et des conditions expérimentales, en indiquant le type et les dimensions de la colonne d'analyse (et de la colonne de garde), du dispositif de détection, de la phase mobile (rapport des composants et pH), de la plage des températures pendant les mesures,

— temps mort et méthode appliquée pour l'évaluer,

— quantités de substances de référence et d'essai injectées dans la colonne,

— temps de rétention des composés de référence employés pour l'étalonnage,

— détails de la courbe de régression ajustée (log k' en fonction de log K_{oc}) et représentation graphique de cette courbe,

— valeurs moyennes de rétention et valeur estimée du log K_{oc} de la substance d'essai,

— chromatogrammes.

3. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.

(2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1 67.

(3) G. G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(4) C. T. Chiou, P. E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, pp. 227-231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, pp. 297-312.

▼B

(6) C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, pp. 831-832.

(7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, pp. 833-846.

(8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121-128.

(9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.

(10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), pp. 2341-2352.

(11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, pp. 28 5-304.

(12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), pp. 1373-1384.

▼B

Appendice

Tableau 1

Comparaison entre les valeurs de K_{oc} sur les sols et les boues d'épuration et les valeurs calculées suivant la méthode de sélection par HPLC ([1]) ([2])

Type de substance	N° CAS	Log K_{oc} pour boues d'épuration	Lo Log K_{oc} par HPLC	Δ	Log Log K_{oc} pour sols	Lo Log K_{oc} par HPLC	Δ
Atrazine	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fenthion	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Phénanthrène	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Benzoate de phényle	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamide	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobenzamide	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acétanilide	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Aniline	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dichloroaniline	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

([1]) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), pp. 121-128.
([2]) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), pp. 107-119.

Tableau 2

Résultats des essais comparatifs inter-laboratoires (11 laboratoires participants) en vue d'améliorer et de valider la méthode par HPLC ([1])

Type de substance	N° CAS	Log K_{oc}		Log K_{oc}
		(OCDE 106)	[Méthode par HPLC|	
Atrazine	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapenthénol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fenthion	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

([1]) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30 (7), pp. 1373-1384.

▼B

Tableau 3

Substances de référence recommandées pour des essais de sélection par HPLC d'après des données relatives à l'adsorption sur les sols

Substance de référence	N° CAS	Valeurs moyennes de log K_{oc} d'après la méthode par agitation	Nombre de résultats pour le K_{oc}	Écart type du log	Source
Acétanilide	103-84-4	1,25	4	0,48	[a]
Phénol	108-95-2	1,32	4	0,70	[a]
2-Nitrobenzamide	610-15-1	1,45	3	0,90	[b]
N.N-diméthylbenzamide	611-74-5	1,52	2	0,45	[a]
4-Méthylbenzamide	619-55-6	1,78	3	1,76	[a]
Benzoate de méthyle	93-58-3	1,80	4	1,08	[a]
Atrazine	1912-24-9	1,81	3	1,08	[c]
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	[c]
3-Nitrobenzamidc	645-09-0	1,95	3	1,31	[b]
Aniline	62-53-3	2,07	4	1,73	[a]
3,5-Dinitrobenzamide	121-81-3	2,31	3	1,27	[b]
Carbendazime	10605-21-7	2,35	3	1,37	[c]
Triadiménol	55219-65-3	2,40	3	1,85	[c]
Triazoxyde	72459-58-6	2,44	3	1,66	[c]
Triazophos	24017-47-8	2,55	3	1,78	[c]
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	[c]
Naphtalène	91-20-3	2,75	4	2,20	[a]
Endosulfane-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	[c]
Méthiocarbe	2032-65-7	3,10	4	2,39	[c]
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	[a]
1,2,3-Trichlorobenzène	87-61-6	3,16	4	1,40	[a]
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	[a]
Fenchion	55-38-9	3,31	3	2,49	[c]
Direct Red 8 1	2610-11-9	3,43	4	2,68	[a]
Pyrazophos	13457-18-6	3,65	3	2,70	[c]
α-Endosulfane	959-98-8	4,09	5	3,74	[c]
Diclofop-méthyle	i 51338-27-3	4,20	3	3,77	[c]
Phénanthrène	85-01-8	4,09	4	3,83	[a]
Basic Blue 41 (mix)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	[a]
DDT	50-29-3	5,63	1		[b]

([a]) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmug; des orptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No 106 01044 (1994).
([b]) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Chemosphere, 22, pp. 285-304.
([c]) Données communiquées par les industriels.

▼M7

C.20. *DAPHNIA MAGNA*, ESSAI DE REPRODUCTION

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 211(2012) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement mises à jour pour intégrer les progrès de la science. La ligne directrice 211 a pour origine la ligne directrice 202 — Partie II: «*Daphnia* sp., essai de reproduction» (1984). Il était généralement admis que les résultats obtenus au cours d'essais pratiqués selon la ligne directrice 202 pouvaient être variables. De ce fait, des efforts considérables ont été déployés pour découvrir les raisons de cette variabilité, en vue de mettre au point une meilleure méthode d'essai. La ligne directrice 211 est le fruit des activités de recherche, des essais interlaboratoires et des études de validation réalisés en 1992 (1), 1994 (2) et 2008 (3).

Les principales différences entre la version initiale (ligne directrice 202, 1984) et la deuxième version (ligne directrice 211, 1998) de la ligne directrice sont les suivantes:

— l'espèce recommandée est *Daphnia magna*;

— la durée de l'essai est de 21 jours;

— pour les essais semi-statiques, le nombre d'animaux à utiliser pour chaque concentration d'essai a été réduit: il est passé d'au moins 40, répartis de préférence en quatre groupes de 10 animaux, à au moins 10 animaux traités individuellement (mais différents modes opératoires peuvent être appliqués pour les essais en écoulement continu);

— des recommandations plus spécifiques ont été formulées quant au milieu d'essai et aux conditions d'alimentation.

— Les principales différences entre la deuxième version de la ligne directrice (211, 1998) et la version actuelle sont les suivantes:

— l'appendice 7 a été ajouté pour décrire les procédures permettant l'identification du sexe des descendants si cela est requis. Conformément aux versions précédentes de cette méthode d'essai, l'identification du sexe des descendants est une observation optionnelle;

— la variable de réponse exprimée par le nombre de descendants vivants par animal parent survivant a été complétée par une variable de réponse supplémentaire correspondant à la reproduction de *Daphnia*, à savoir le nombre total de descendants vivants produits à la fin de l'essai par organisme parent présent au début de l'essai, en excluant de l'analyse la mortalité parentale aléatoire (accidentelle et/ou fortuite). Cette variable de réponse est ajoutée à des fins d'harmonisation de ce paramètre avec les autres méthodes d'essai de reproduction chez les invertébrés. En outre, la présente méthode d'essai permet d'éliminer une source d'erreur sur cette variable, à savoir l'effet de la mortalité parentale fortuite et/ou accidentelle éventuellement observée pendant la période d'exposition.

— D'autres indications statistiques portant sur la conception de l'essai et le traitement des résultats ont été ajoutées, tant pour la CE_x (p. ex. CE_{10} ou CE_{50}) que pour l'approche fondée sur la CSEO/CMEO.

— Un essai limite a été introduit.

Les définitions utilisées sont données à l'appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

Le principal objectif de l'essai consiste à évaluer l'effet de produits chimiques sur le taux de reproduction de *Daphnia magna*. Pour ce faire, de jeunes femelles de *Daphnia* (les animaux parents), âgées de moins de 24 heures au début de l'essai, sont exposées au produit chimique d'essai ajouté à l'eau à différentes concentrations. L'essai dure 21 jours. À la fin de l'essai, le nombre total de descendants vivants produits est évalué. Le taux de reproduction des animaux parents peut s'exprimer autrement (p. ex. par le nombre de descendants vivants engendrés par animal et par jour, à partir du premier jour où des descendants ont été observés), mais ces résultats sont fournis en plus du nombre total de descendants vivants

▼M7

produits à la fin de l'essai. Du fait du mode opératoire particulier des essais semi-statiques par rapport aux autres méthodes d'essai sur la reproduction des invertébrés, il est également possible de compter le nombre de descendants vivants produits individuellement par chaque animal parent. Ainsi, contrairement aux autres méthodes d'essais sur la reproduction des invertébrés, on peut exclure de l'analyse les données correspondant aux descendants d'un animal parent décédé de manière accidentelle et/ou fortuite pendant l'exposition. En l'occurrence, si une mortalité parentale se produit dans les réplicats exposés à la substance d'essai, il convient d'analyser si cette mortalité suit une courbe concentration-response, par exemple s'il existe une régression significative de la réponse par rapport à la concentration testée du produit chimique d'essai, avec une pente positive (un test statistique tel que le test de tendance de Cochran-Armitage peut être utilisé à cet effet). Si la mortalité parentale ne suit pas de courbe concentration-réponse, alors les réplicats montrant une mortalité parentale sont exclus de l'analyse des résultats. Si la mortalité parentale suit une courbe de concentration-réponse, cette mortalité est assimilée à un effet du produit chimique testé et les réplicats ne sont pas exclus de l'analyse des résultats. Si le parent meurt au cours de l'essai de manière accidentelle ou fortuite non liée au produit chimique testé, ou se révèle être un parent de sexe masculin, alors le réplicat est exclu de l'analyse des résultats (voir paragraphe 51). L'effet toxique du produit chimique d'essai sur le taux de reproduction est mesuré par la CEx, les données étant ajustées à un modèle approprié au moyen d'une régression non linéaire en vue d'estimer la concentration qui entraînerait x % de réduction du taux de reproduction, respectivement, ou encore par celle de la CSEO/CMEO (4). *Il est préférable que les concentrations d'essai encadrent la concentration efficace minimale (p. ex. CE_{10}), de sorte que cette valeur soit déterminée par interpolation et non par extrapolation.*

Il convient aussi d'indiquer le taux de survie des animaux parents et le moment de la première portée. D'autres effets liés au produit chimique sur des paramètres tels que la croissance (p. ex. la longueur) et éventuellement le taux intrinsèque d'accroissement de la population peuvent aussi être examinés (voir paragraphe 44).

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE D'ESSAI

Les résultats d'un essai de toxicité aiguë (voir chapitre C.2 de la présente annexe *Daphnia* sp., essai d'immobilisation immédiate) réalisé sur *Daphnia magna* peuvent être utiles pour sélectionner une gamme de concentrations d'essai adaptée aux essais de reproduction. Il convient que la solubilité dans l'eau et la pression de vapeur du produit chimique d'essai soient connues. De même, il convient de disposer d'une méthode d'analyse fiable pour doser le produit chimique dans les solutions d'essai dont le rendement de récupération et la limite de détermination sont connus.

Des informations sur le produit chimique d'essai qui peuvent être utiles pour établir les conditions de l'essai comprennent la formule structurale, la pureté du produit chimique, la stabilité à la lumière, la stabilité dans les conditions de l'essai, le pKa, le coefficient de partage P_{oe} et les résultats d'un essai de biodégradabilité immédiate [voir les chapitres C.4 (détermination de la biodégradabilité facile) et C.29 (Biodégradabilité facile — dégagement de CO_2 dans des flacons hermétiquement clos) de la présente annexe.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

Pour que l'essai soit valide, il convient que les témoins remplissent les critères de performance suivants:

— la mortalité des animaux parents (*Daphnia* femelles) ne dépasse pas 20 % à la fin de l'essai;

— le nombre moyen de descendants vivants par animal parent survivant à la fin de l'essai est $\geq$ 60.

Note: Le même critère de validité (20 %) peut s'appliquer pour la mortalité parentale aléatoire ou accidentelle chez les témoins ainsi que pour chacune des concentrations d'essai.

▼M7

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

Les récipients et autres équipements qui sont amenés à entrer en contact avec les solutions d'essai sont intégralement en verre, ou en un autre matériau chimiquement inerte. On utilisera en principe des béchers en verre.

En outre, il sera nécessaire d'employer une partie ou la totalité du matériel suivant:

— appareil pour mesurer la concentration de l'oxygène (à l'aide d'une microélectrode ou d'un autre dispositif destiné à mesurer l'oxygène dissous dans des échantillons de faible volume);

— appareillage adéquat pour maintenir la température constante;

— pH-mètre;

— appareil pour mesurer la dureté de l'eau;

— appareil pour déterminer la concentration de carbone organique total (COT) dans l'eau ou la demande chimique en oxygène (DCO);

— dispositif approprié pour régler le régime d'éclairage et mesurer l'intensité lumineuse.

Organisme d'essai

L'espèce à utiliser dans cet essai est *Daphnia magna* Straus ([1]).

Le clone devrait de préférence avoir été identifié d'après son génotype. La recherche (1) a montré que la capacité reproductrice du clone A (originaire de l'IRCHA, en France) (5) répond de façon stable au critère de validité qui stipule une moyenne $\geq$ 60 descendants vivants par animal parent survivant lorsqu'il est élevé dans les conditions que décrit la présente méthode d'essai. D'autres clones sont toutefois acceptables à condition de prouver que la culture de *Daphnia* remplit les critères de validité pour l'essai.

Au début de l'essai, les animaux sont âgés de moins de 24 heures et ne peuvent pas provenir d'une première génération de descendants. Ils sont issus d'un lot sain (c'est-à-dire qui ne présente pas de signes de stress, tels qu'une mortalité élevée, la présence de mâles et d'éphippies, un retard dans la production des premiers descendants, des animaux décolorés, etc.). Le lot d'animaux est maintenu dans des conditions de culture (lumière, température, milieu, alimentation et nombre d'animaux par unité de volume) semblables à celles qui seront appliquées au cours de l'essai. Si le milieu utilisé dans l'essai est différent de celui où sont normalement élevées les *Daphnia*, il convient de laisser aux *Daphnia* une période d'acclimatation, avant l'essai, qui dure habituellement trois semaines environ (c'est-à-dire une génération), afin d'éviter de stresser les animaux parents.

Milieu d'essai

Il est recommandé d'utiliser un milieu entièrement défini dans cet essai. On peut ainsi éviter d'employer des additifs (p. ex. des algues, des extraits de sol), qui sont difficiles à caractériser, et améliorer les possibilités de normalisation entre les laboratoires. Les milieux Elendt M4 (6) et M7 (voir appendice 2) se sont révélés pertinents à cette fin. D'autres milieux sont cependant acceptables [par exemple (7) et (8)], à condition que les *Daphnia* élevées dans ces milieux satisfassent aux critères de validité établis pour l'essai.

([1]) On peut faire appel à d'autres espèces de *Daphnia* à condition qu'elles respectent les critères de validité pertinents (le critère relatif au taux de reproduction des témoins s'applique aux espèces de *Daphnia*). Si d'autres espèces de *Daphnia* sont employées, il y a lieu de les identifier clairement et de justifier leur utilisation.

▼M7

Si le milieu utilisé contient des additifs non définis, ceux-ci seront spécifiés clairement et le rapport d'essai devra comporter des informations sur la composition, notamment la teneur en carbone, étant donné qu'elle peut contribuer au régime alimentaire fourni. On préconise de déterminer le carbone organique total (COT) et/ou la demande chimique en oxygène (DCO) de la solution mère de l'additif organique et d'estimer leur incidence sur le COT et la DCO du milieu d'essai. En outre, il est conseillé de maintenir les niveaux de COT dans le milieu (c'est-à-dire avant l'ajout des algues) inférieurs à 2 mg/l (9).

Lorsque l'on teste des produits chimiques contenant des métaux, il est important de reconnaître que les propriétés du milieu d'essai (p. ex. la dureté, le pouvoir de chélation) peuvent influencer leur toxicité. C'est pourquoi il est souhaitable d'opérer dans un milieu entièrement défini. Néanmoins, dans l'état actuel des connaissances, les seuls milieux entièrement définis qui conviennent aux cultures à long terme de *Daphnia magna* sont Elendt M4 et M7. Ces deux milieux contiennent l'agent chélatant EDTA. Des travaux ont montré (2) que la «toxicité apparente» du cadmium est généralement moindre lorsque l'essai de reproduction est effectué dans les milieux M4 et M7, que dans des milieux ne contenant pas d'EDTA. M4 et M7 ne sont donc pas recommandés pour tester des produits chimiques contenant des métaux, de même que d'autres milieux contenant des agents chélatants connus. Il est souhaitable d'utiliser un autre milieu pour les produits chimiques renfermant des métaux, par exemple l'eau douce calcaire reconstituée d'ASTM (9), qui ne contient pas d'EDTA. La combinaison de l'eau douce calcaire reconstituée d'ASTM et de l'extrait d'algues (10) convient également aux cultures à long terme de *Daphnia magna* (2).

La concentration de l'oxygène dissous est supérieure à 3 mg/L au début de l'essai et durant celui-ci. Le pH est compris entre 6 et 9 et normalement ne pas varier de plus de 1.5 unité au cours d'un même essai. Une dureté supérieure à 140 mg/l (en $CaCO_3$) est recommandée. La capacité reproductrice des animaux dans les essais pratiqués à un niveau au moins égal à ce seuil s'est révélée conforme aux critères de validité (11) (12).

Solutions d'essai

Les solutions d'essai sont généralement amenées à la concentration voulue par dilution d'une solution mère. Idéalement, les solutions mères sont préparées sans solvants ni dispersants, dans la mesure du possible, en mélangeant ou en agitant le produit chimique d'essai dans le milieu d'essai par des moyens mécaniques comme l'agitation ou le traitement aux ultrasons, ou d'autres méthodes appropriées. Il est préférable d'exposer les systèmes d'essai aux concentrations du produit chimique d'essai qui seront employées dans l'étude, aussi longtemps que nécessaire pour démontrer que l'on peut maintenir des concentrations d'exposition stables avant d'introduire les organismes d'essai. Si le produit chimique d'essai est difficile à dissoudre dans l'eau, il convient de suivre les procédures décrites dans le document d'orientation de l'OCDE relatif à l'essai de substances difficiles (13). Le recours à des solvants ou à des dispersants devrait être évité, mais peut se révéler nécessaire dans certains cas pour obtenir une solution mère de concentration appropriée pour l'exposition.

Outre les concentrations à tester, l'essai comprendra un témoin de l'eau de dilution et, si cela est impératif, un solvant témoin, avec le nombre de réplicats respectifs adéquat. Seuls les solvants ou les dispersants dont les effets sur la variable de réponse se sont avérés non significatifs ou minimes seront utilisés dans l'essai. Des exemples de solvants (p. ex. acétone, éthanol, méthanol, diméthylformamide et triéthylène glycol) et de dispersants (p. ex. Cremophor RH40, méthylcellulose 0,01 % et HCO-40) adéquats sont fournis dans le document (13). En cas d'utilisation d'un solvant ou d'un dispersant, sa concentration finale ne

▼M7

dépasse pas 0,1 ml/l (13) et il est identique dans tous les récipients d'essai, sauf pour le témoin de l'eau de dilution. Cependant, on mettra tout en œuvre pour limiter la teneur en solvant autant que faire se peut.

MODE OPÉRATOIRE

Conditions d'exposition

Durée

La durée de l'essai est de 21 jours.

Charge

Les animaux parents sont répartis individuellement dans des récipients d'essai contenant en général 50 à 100 ml de milieu chacun (avec *Daphnia magna*, on peut abaisser ce volume, notamment pour les daphnies de plus petite taille comme *Ceriodaphnia dubia*), à moins qu'un essai dynamique ne soit requis.

Il est parfois nécessaire d'avoir recours à des volumes plus grands, afin de pouvoir appliquer la méthode d'analyse utilisée pour déterminer la concentration du produit chimique d'essai, bien qu'il soit aussi possible de regrouper les réplicats aux fins de l'analyse chimique. Si des volumes supérieurs à 100 ml sont employés, il faudra peut-être augmenter la ration distribuée aux *Daphnia*, afin que la nourriture disponible soit suffisante et que les critères de validité soient satisfaits.

Animaux d'essai

Pour les essais semi-statiques, on utilisera au moins 10 animaux répartis individuellement à chaque concentration d'essai et au moins 10 animaux répartis individuellement dans la série des témoins.

Pour les essais dynamiques, il s'avère approprié d'utiliser 40 animaux répartis en quatre groupes de 10 à chaque concentration d'essai (1). Un plus petit nombre d'organismes d'essai peut être utilisé, mais on recommande d'employer au moins 20 animaux par concentration, répartis dans au moins deux récipients contenant le même nombre d'animaux (p. ex. quatre réplicats contenant cinq daphnies chacun). On notera qu'en ce qui concerne les essais où les animaux sont maintenus en groupes, il sera impossible d'exclure un descendant de l'analyse statistique en cas de mort fortuite/accidentelle d'un parent à partir du moment où la reproduction a commencé. Le cas échéant, il faudra donc exprimer le taux de reproduction par le nombre total de descendants vivants par parent présent au début de l'essai.

Les traitements sont répartis de façon aléatoire entre les récipients d'essai, et toutes les manipulations ultérieures de ceux-ci se font de même. Faute de quoi, les résultats pourraient présenter un biais qui risquerait d'être interprété comme un effet de la concentration. Notamment, si les unités expérimentales sont manipulées par ordre de traitement ou de concentration, certains effets liés au temps, comme la fatigue du manipulateur ou d'autres erreurs, pourraient avoir un impact plus prononcé aux concentrations supérieures. En outre, si les résultats de l'essai sont susceptibles d'être affectés par une condition initiale ou liée à l'environnement, comme la situation dans le laboratoire, il faut envisager d'arrêter l'essai.

Alimentation

Dans les essais semi-statiques, on préconise d'administrer une ration quotidienne, ou au moins trihebdomadaire (ce qui correspond au renouvellement du milieu). Une dilution éventuelle des concentrations d'exposition due à l'administration de nourriture sera prise en compte et évitée autant que faire se peut, à l'aide de suspensions d'algues de concentration adéquate (voir paragraphe 29). Les écarts à ce régime (p. ex. dans les essais dynamiques) sont signalés.

Au cours de l'essai, le régime alimentaire des animaux parents sera de préférence composé d'algues unicellulaires vivantes appartenant à une ou plusieurs espèces parmi les suivantes: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (anciennement *Selenastrum capricornutum*) et *Desmodesmus subspicatus* (anciennement *Scenedesmus subspicatus*). La nourriture est dispensée en fonction de la teneur en carbone organique (C) fournie à chaque animal parent. La recherche (14) a montré que pour *Daphnia magna*, des teneurs comprises entre 0,1 et 0,2 mg de C/*Daphnia*/jour dans la ration alimentaire suffisent pour produire le nombre de descendants vivants requis selon les critères de validité. On peut fournir des rations à teneur constante tout au long de l'essai ou utiliser des teneurs plus

▼M7

faibles au début, que l'on augmentera afin de tenir compte de la croissance des animaux parents. Dans ce cas, la ration devra toujours contenir entre 0,1 et 0,2 mg de C/*Daphnia*/jour, qui est la teneur recommandée.

Si des paramètres de remplacement, comme le nombre de cellules d'algues ou l'absorbance de la lumière, sont utilisés pour doser la teneur en carbone requise dans la ration alimentaire (notamment pour des raisons pratiques, si la mesure de la teneur en carbone est trop longue), chaque laboratoire est tenu de produire son propre nomogramme reliant le paramètre de remplacement à la teneur en carbone de la culture d'algues (des conseils concernant l'établissement d'un nomogramme sont donnés à l'appendice 3). Les nomogrammes devraient être vérifiés au moins une fois par an, et plus souvent si les conditions de culture des algues ont changé. Il a été démontré que l'absorbance de la lumière donne une meilleure indication de la teneur en carbone que le nombre de cellules (15).

Il convient d'administrer une suspension d'algues concentrée aux *Daphnia* afin de réduire au minimum le volume du milieu de culture des algues transféré dans les récipients d'essai. On peut concentrer les algues par centrifugation, puis remise en suspension dans le milieu de culture des *Daphnia*.

Lumière

16 heures de lumière à une intensité ne dépassant pas 15-20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, mesurée au niveau de la surface de l'eau dans le récipient. En ce qui concerne les intruments de mesure de la lumière étalonnés en lux, la gamme de 1000 — 1500 lux pour la lumière blanche froide correspond étroitement à l'intensité lumineuse recommandée de 15-20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

Température

La température du milieu d'essai sera comprise entre 18 °C et 22 °C. Toutefois, dans un même essai, la température ne varie pas, si possible, quotidiennement de plus de 2 °C au sein de cet intervalle (p. ex. 18 — 20 °C, 19 — 21 °C ou 20 — 22 °C). Il peut être utile d'utiliser un récipient d'essai supplémentaire pour surveiller la température.

Aération

Les récipients d'essai ne sont pas aérés durant l'essai.

Dispositif d'essai

Essai préliminaire de détermination des concentrations

Si nécessaire, un essai de détermination de l'ordre de grandeur sera mené avec, par exemple, cinq concentrations du produit chimique d'essai. On utilisera deux réplicats par concentration d'essai et par témoin. Des informations supplémentaires, provenant d'essais avec des produits chimiques similaires ou tirées d'études déjà publiées et portant sur la toxicité aiguë pour *Daphnia* et/ou d'autres organismes aquatiques peuvent également être utiles pour décider de la gamme de concentrations à utiliser dans l'essai de détermination de l'ordre de grandeur.

L'essai de détermination de l'ordre de grandeur dure 21 jours ou suffisamment longtemps pour prévoir l'ampleur des effets de manière fiable. À l'issue de cet essai, on étudie la reproduction de *Daphnia*. Le nombre de parents et la production de descendants sont consignés.

Essai définitif

Normalement, on teste au moins cinq concentrations d'essai qui encadrent la concentration efficace (p. ex. CE_x), et forment une série géométrique avec des concentrations successives séparées, de préférence, par un facteur inférieur ou égal à 3.2. Il convient d'utiliser un nombre approprié de réplicats pour chaque concentration d'essai (voir paragraphes 24-25). L'étude de moins de cinq concentrations fait l'objet d'une justification. Il convient de ne pas tester les produits chimiques au-dessus de leur limite de solubilité dans le milieu d'essai. Avant de

▼M7

réaliser l'expérience, il est souhaitable d'examiner l'efficacité statistique du mode opératoire et de faire appel à des méthodes statistiques appropriées (4). Lors de l'établissement de la gamme de concentrations, il convient de tenir compte des points suivants:

(i) Si l'on veut estimer une CE_x relative aux effets sur la reproduction, il est conseillé d'utiliser suffisamment de concentrations pour définir la CE_x avec un niveau de confiance satisfaisant. Dans l'idéal, les concentrations d'essai encadrent la CE_x estimée de manière à ce que cette dernière puisse être déterminée par interpolation plutôt que par extrapolation. L'analyse statistique qui suit est favorisée si davantage de concentrations d'essai sont utilisées (p. ex. 10) avec moins de réplicats pour chaque concentration (p. ex. 5, ce qui maintient constant le nombre total de récipients) et 10 témoins.

(ii) Si l'on cherche à déterminer la CMEO et/ou la CSEO, la plus faible concentration testée est suffisamment basse pour que le taux de reproduction à cette concentration ne soit pas significativement inférieur à celui du groupe témoin. Dans le cas contraire, il convient de recommencer l'essai en abaissant la concentration la plus faible.

(iii) Si l'on cherche à déterminer la CMEO et/ou la CSEO, la plus forte concentration testée est suffisamment élevée pour que le taux de reproduction à cette concentration soit significativement inférieur à celui du groupe témoin. Dans le cas contraire, il convient de recommencer l'essai en augmentant la concentration la plus forte, à moins que celle-ci corresponde déjà à la concentration maximale requise pour tester les effets chroniques (soit 10 mg/l).

Si aucun effet n'est observé à la plus forte concentration utilisée lors de la détermination de l'ordre de grandeur (p. ex. 10 mg/l), ou s'il est très probable que le produit chimique d'essai présentera une toxicité faible voire nulle du fait de son innocuité pour d'autres organismes et/ou parce que ces derniers l'absorbent peu ou pas du tout, il est possible de mener l'essai de reproduction comme un essai limite, en testant un témoin et une concentration de la substance d'essai de 10 mg/l, par exemple. Il convient alors d'utiliser dix réplicats pour les groupes exposés et pour les témoins. Si l'essai limite requiert un système dynamique, moins de réplicats pourront convenir. Un essai limite permettra de démontrer l'absence d'effet statistiquement significatif à la concentration limite. Néanmoins, si des effets apparaissent à cette occasion, un essai complet sera normalement nécessaire.

Témoins

Il convient de tester une série de témoins du milieu d'essai et, le cas échéant, une série de témoins contenant le solvant ou le dispersant, parallèlement aux séries traitées avec le produit chimique d'essai. En cas de recours à un solvant ou à un dispersant, leur concentration est la même que dans les récipients qui contiennent le produit chimique d'essai. Il convient d'utiliser un nombre approprié de réplicats (voir paragraphes 23-24).

Généralement, dans un essai correctement mené, le coefficient de variation autour du nombre moyen de descendants vivants par animal parent dans le ou les groupes témoins est $\leq$ 25 %, et cette information est communiquée pour les essais où les animaux sont maintenus dans des récipients individuels.

Renouvellement du milieu d'essai

La fréquence de renouvellement du milieu dépendra de la stabilité du produit chimique d'essai, mais devrait être au moins trihebdomadaire. Si les essais préliminaires de stabilité (voir paragraphe 7) montrent que la concentration du produit chimique d'essai n'est pas stable (c'est-à-dire qu'elle sort de la gamme de 80 — 120 % de la concentration nominale ou tombe en dessous de 80 % de la concentration initiale mesurée) durant la période de renouvellement la plus longue (3 jours), il faut envisager de renouveler le milieu plus fréquemment ou de pratiquer un essai dynamique.

▼M7

Lors du renouvellement du milieu dans les essais semi-statiques, on prépare une deuxième série de récipients d'essai en vue d'y transférer les animaux parents avec, par exemple, une pipette en verre d'un diamètre approprié. Il convient que le volume de milieu transféré avec les *Daphnia* soit le plus petit possible.

Observations

Les résultats des observations effectuées durant l'essai sont consignés dans des fiches de données (voir exemples aux appendicees 4 et 5). Si d'autres mesures s'imposent (voir paragraphe 44), des observations supplémentaires pourront être requises.

Descendance

Les descendants engendrés par chaque animal parent seront de préférence retirés et comptés quotidiennement, dès la première portée, pour qu'ils ne consomment pas la nourriture destinée aux parents. Aux fins de la présente méthode d'essai, on ne compte que les descendants vivants, mais la présence d'œufs avortés ou de descendants morts est signalée.

Mortalité

La mortalité des animaux parents est notée, de préférence quotidiennement, et au moins à chaque comptage des descendants.

Autres paramètres

Bien que la présente méthode d'essai soit avant tout destinée à évaluer les effets sur le taux de reproduction, il se peut que d'autres effets soient suffisamment chiffrés pour se prêter à une analyse statistique. On pourra ainsi rapporter le taux de reproduction par animal parent survivant, c'est-à-dire le nombre de descendants vivants produits pendant l'essai par parent survivant. Cette donnée pourra être comparée à la principale variable de réponse (taux de reproduction par animal parent présent au début de l'essai et qui n'est pas mort de manière fortuite ou accidentelle pendant l'expérience). Si une mortalité parentale se produit dans les réplicats exposés au produit chimique d'essai, il convient d'analyser si cette mortalité suit une courbe concentration-response, par exemple s'il existe une régression significative de la réponse par rapport à la concentration testée du produit chimique d'essai, avec une pente positive (un test statistique tel que le test de tendance de Cochran-Armitage peut être utilisé à cet effet). Si la mortalité parentale ne suit pas de courbe concentration-réponse, alors les réplicats montrant une mortalité parentale sont exclus de l'analyse des résultats. Si la mortalité parentale suit une courbe de concentration-réponse, cette mortalité est assimilée à un effet du produit chimique testé et les réplicats ne sont pas exclus de l'analyse des résultats. Voir détails au paragraphe 51. La mesure de la croissance est très intéressante, puisqu'elle fournit des indications sur les éventuels effets sublétaux, ce qui peut se révéler utile pour compléter les résultats sur la reproduction. On préconise de mesurer la longueur des animaux parents (la longueur du corps sans l'épine anale) à la fin de l'essai. D'autres paramètres peuvent être mesurés ou calculés: le moment de la première portée (et des portées suivantes), le nombre et la taille des portées par animal, le nombre de portées avortées, la présence de mâles parmi les néonates (OCDE, 2008) ou d'éphippies et, éventuellement, le taux intrinsèque d'accroissement de la population (voir définition à l'appendice 1 et procédures d'identification du sexe des néonates à l'appendice 7).

Fréquence des dosages analytiques et des mesures

La concentration de l'oxygène, la température, la dureté et le pH sont mesurés au moins une fois par semaine, avant et après le renouvellement des milieux, chez les témoins et dans les récipients qui renferment la concentration la plus élevée du produit chimique d'essai.

Au cours de l'essai, les concentrations du produit chimique à tester sont déterminées à intervalles réguliers.

Dans les essais semi-statiques, où l'on suppose que la concentration du produit chimique d'essai ne s'écartera pas de plus de 20 % de la concentration nominale (c'est-à-dire qu'elle restera comprise dans un intervalle de 80 à 120 %, voir paragraphes 6, 7 et 39), on recommande, au minimum, d'analyser les concentrations d'essai la plus élevée et la plus basse, dès leur préparation et au moment

▼M7

du renouvellement, dans les milieux qui viennent d'être renouvelés et dans ceux qui sont sur le point de l'être, une fois au cours de la première semaine de l'essai (les analyses seront pratiquées sur des échantillons prélevés dans la même solution, juste après la préparation de la solution et au moment du renouvellement). Ces déterminations sont ensuite répétées selon une fréquence au moins hebdomadaire.

S'agissant des essais où la concentration du produit chimique d'essai n'est pas supposée demeurer dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale, il est nécessaire d'analyser toutes les concentrations d'essai, juste après leur préparation et au moment du renouvellement. Cependant, pour les essais où la concentration initiale mesurée du produit chimique d'essai sort de l'intervalle de ± 20 % de la concentration nominale, mais pour lesquels on peut montrer de façon suffisamment convaincante que les concentrations initiales sont répétables et stables (c'est-à-dire comprises dans un intervalle de 80 à 120 % des concentrations initiales), les déterminations chimiques peuvent se limiter durant les deuxième et troisième semaines aux concentrations d'essai la plus élevée et la plus basse. En tout état de cause, la détermination de la concentration du produit chimique d'essai avant le renouvellement n'est nécessaire que sur un seul réplicat de chaque concentration d'essai.

Si on pratique un essai dynamique, il convient de recourir à un régime de prélèvements identique à celui décrit pour les essais semi-statiques (mais l'analyse des solutions «anciennes» ne s'applique pas ici). Toutefois, il peut être souhaitable d'augmenter le nombre de prélèvements durant la première semaine (p. ex. trois séries de mesures) afin de vérifier la stabilité des concentrations d'essai. Dans ces types d'essai, le débit du diluant et du produit chimique d'essai sont contrôlés chaque jour.

S'il s'avère que la concentration du produit chimique d'essai a pu être correctement maintenue tout au long de l'essai dans un intervalle de ± 20 % de la concentration initiale mesurée ou nominale, les résultats peuvent être déduits des valeurs initiales mesurées ou nominales. Si l'écart par rapport à la concentration initiale mesurée ou nominale est supérieur à ± 20 %, les résultats sont exprimés par rapport à la moyenne pondérée en fonction du temps (voir les conseils de calcul à l'appendice 6).

RÉSULTATS ET RAPPORTS

Traitement des résultats

Le présent essai a pour objet d'établir l'effet du produit chimique d'essai sur le taux de reproduction. Le nombre total de descendants vivants par animal parent est calculé pour chaque récipient d'essai (c'est-à-dire pour chaque réplicat). En outre, la reproduction peut être évaluée en s'appuyant sur la production de descendants vivants par les organismes parents survivants. Cependant, la variable de réponse la plus pertinente du point de vue écologique est le nombre total de descendants vivants par animal parent qui n'est pas mort de manière accidentelle ([1]) ou fortuite ([2]) au cours de l'essai. Si un animal parent meurt, soit accidentellement, soit de manière fortuite, ou s'il se révèle être un mâle, le réplicat est exclu de l'analyse. L'analyse reposera alors sur un nombre réduit de réplicats. Si un animal parent meurt dans un récipient recevant le produit chimique d'essai, il convient d'examiner si la mortalité suit une fonction concentration-réponse, notamment s'il existe une régression importante de la réponse en fonction de la concentration de produit chimique d'essai avec une pente positive (on pourra appliquer un test statistique comme le test de tendance de Cochran — Armitage à cette fin). Si la mortalité ne correspond pas à une fonction concentration-réponse, les réplicats présentant une mortalité parentale sont exclus de l'analyse des résultats de l'essai. Si la mortalité suit une fonction concentration-réponse, la mortalité parentale est considérée comme un effet du produit chimique d'essai et les réplicats concernés ne sont pas exclus de l'analyse des résultats de l'essai.

En résumé, si les effets sont exprimés par la CMEO et la CSEO ou par la CE_x, il est recommandé de calculer les effets sur la reproduction selon les deux variables de réponse mentionnées précédemment, à savoir;

([1]) Mortalité accidentelle: mortalité sans lien avec le produit chimique d'essai et due à un événement accidentel (dont la cause est donc connue)

([2]) Mortalité fortuite: mortalité sans lien avec le produit chimique d'essai, de cause inconnue

▼M7

— le nombre total de descendants vivants par animal parent non décédé de manière accidentelle ou fortuite pendant l'essai;

— le nombre de descendants vivants par animal parent survivant;

puis de choisir comme résultat final la valeur la plus faible des CSEO et CMEO ou CE_x déterminées avec ces deux différentes variables.

Avant de lancer l'analyse statistique, par exemple de type ANOVA ou la comparaison des groupes de traitement et des groupes témoins avec les tests de Student (test t), de Dunnett, de Williams, ou de Jonckheere — Terpstra (méthode descendante), il est conseillé de vérifier s'il est nécessaire de transformer les données pour satisfaire les exigences d'un test statistique particulier. Des méthodes non paramétriques peuvent être envisagées, comme les tests de Dunn ou de Mann — Whitney. Les intervalles de confiance à 95 % sont calculés pour les moyennes établies aux différentes concentrations.

Le nombre de parents survivants dans les témoins non traités constitue un critère de validité crucial, et il convient qu'il soit consigné et signalé. Par ailleurs, on versera au rapport tout autre signe indiquant un effet nocif, par exemple un comportement anormal, ainsi que les résultats toxicologiques importants.

CEx

On calcule les CEx et leurs limites de confiance supérieures et inférieures en utilisant des méthodes statistiques adéquates (p. ex. fonction logistique ou de Weibull, méthode simplifiée de Spearman — Karber, ou simple interpolation). Pour calculer la CE10, la CE_{50} ou toute autre CEx, on soumet la série complète de données à une analyse de régression.

CSEO/CMEO

Dans le cas d'une analyse statistique visant à déterminer la CSEO ou la CMEO, il convient d'utiliser des méthodes statistiques adéquates (conformément au Document 54 de l'OCDE intitulé Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application) (4). En général, les effets indésirables du produit chimique d'essai par rapport au témoin sont étudiés en procédant à une vérification de l'hypothèse unilatérale pour $p \leq 0,05$.

La distribution normale et l'homogénéité de la variance peuvent être vérifiées à l'aide d'un test statistique approprié, tel que le test de Shapiro — Wilk et le test de Levene, respectivement ($p \leq 0,05$). Une analyse de la variance à un facteur (ANOVA), puis des tests multi-comparaisons peuvent être effectués. Des tests de comparaisons multiples (test de Dunnett, par exemple) ou des tests d'analyse de tendance descendante (tel que le test de William ou celui de Jonckheere — Terpstra, méthode descendante) peuvent permettre de calculer d'éventuelles différences significatives ($p \leq 0.05$) entre les témoins et les diverses concentrations de produit chimique d'essai [on choisira le test recommandé conformément au Document d'orientation de l'OCDE 54 (4)]. On peut toutefois utiliser des méthodes non paramétriques (tels que le test U de Bonferroni conformément à Holm ou le test de tendance de Jonckheere — Terpstra) pour déterminer la CSEO et la CMEO.

Essai limite

Si un essai limite a été mis en œuvre (comparaison du témoin et d'un seul traitement) et que les conditions requises pour les procédures de tests paramétriques (normalité, homogénéité) sont remplies, on peut évaluer les réponses métriques par le test de Student (test t). Un test t de variance inégale (comme le test de Welch) ou bien un test non paramétrique tel que le test U de Mann — Whitney peuvent être employés lorsque ces conditions ne sont pas satisfaites.

La détermination des différences significatives entre les témoins (témoin et solvant ou dispersant témoin), peut faire appel à l'analyse de plusieurs réplicats pour chaque témoin comme il est décrit pour l'essai limite. Lorsque les essais ne détectent aucune différence significative, il est possible de rassembler tous les réplicats des témoins et du solvant témoin. Dans le cas contraire, on compare tous les traitements avec le solvant témoin.

▼M7

Rapport d'essai

Le rapport d'essai mentionne les informations suivantes:

Produit chimique d'essai:

— état physique et propriétés physico-chimiques pertinentes;

— données permettant l'identification chimique, y compris la pureté.

Espèce d'essai:

— clone (préciser si son génotype a été déterminé), fournisseur ou source (quand elle est connue) et conditions de culture appliquées. Si on utilise une espèce autre que *Daphnia magna* il convient de le signaler et de le justifier.

Conditions d'essai:

— mode opératoire utilisé (par exemple, semi-statique ou dynamique, volume, charge en nombre de *Daphnia* par litre);

— photopériode et intensité lumineuse;

— plan de l'essai (par exemple, nombre de réplicats, nombre de parents par récipient);

— détails du milieu de culture employé;

— le cas échéant, ajout de matière organique (préciser la composition, la source, la méthode de préparation, le COT et la DCO des solutions mères, une estimation du COT et de la DCO résultants dans le milieu d'essai;

— informations détaillées concernant l'alimentation, dont la quantité (en mg de C/*Daphnia*/jour) et l'horaire (p. ex. le type d'aliment(s), y compris, pour les algues, le nom de l'espèce et, si elles sont connues, la variété et les conditions de culture);

— méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (la nature et la concentration du solvant ou du dispersant sont indiquées, le cas échéant).

Résultats:

— résultats des éventuelles études préliminaires sur la stabilité du produit chimique d'essai;

— concentrations d'essai nominales et résultats de toutes les analyses permettant de déterminer la concentration du produit chimique d'essai dans les récipients d'essai (l'appendice 5 fournit des exemples de fiches de données); le rendement de récupération de la méthode et la limite de détermination sont aussi mentionnés;

— qualité de l'eau dans les récipients d'essai (pH, température, concentration de l'oxygène dissous, COT et/ou DCO et dureté, le cas échéant) (l'appendice 4 donne un exemple de fiche de données);

— dénombrement complet des descendants vivants de chaque animal parent produits pendant l'essai (voir exemple de fiche de données à l'appendice 4);

— nombre et dates des décès chez les animaux parents (voir exemple de fiche de données à l'appendice 4);

— coefficient de variation du taux de reproduction chez les témoins (en fonction du nombre total de descendants vivants par animal parent survivant à la fin de l'essai);

— graphique représentant le nombre total de descendants vivants par animal parent pour chaque réplicat, à l'exception des animaux parents morts de manière accidentelle ou fortuite, en fonction de la concentration du produit chimique d'essai;

▼M7

— s'il y lieu, graphique représentant le nombre total de descendants vivants par animal parent survivant dans chaque réplicat en fonction de la concentration du produit chimique d'essai;

— le cas échéant, concentration minimale avec effet observé (CMEO) sur la reproduction, y compris une description des méthodes statistiques utilisées et une indication de l'ampleur de l'effet à prévoir (il est possible d'effectuer une analyse de l'efficacité avant de commencer l'essai pour fournir ces informations), et concentration sans effet observé (CSEO) sur la reproduction; s'il y a lieu, mentionner également la variable de réponse employée pour établir la CMEO et la CSEO (soit le nombre total de descendants vivants par organisme maternel non décédé de manière accidentelle ou fortuite pendant l'essai, soit le nombre total de descendants vivants par organisme maternel survivant) ainsi que la CMEO et la CSEO sur la mortalité des animaux parents;

— s'il y a lieu, CE_x pour la reproduction et intervalles de confiance (par exemple à 90 % ou 95 %), ainsi qu'un graphique du modèle ajusté employé pour ces calculs, la pente de la courbe concentration-réponse et son écart-type;

— autres effets biologiques observés ou mesurés: indiquer tout autre effet biologique observé ou mesuré (p. ex. croissance des animaux parents) avec justification appropriée, le cas échéant;

— explication de tout écart par rapport à la méthode d'essai.

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993.

(2) OCDE (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 6. OCDE, Paris.

(3) OCDE (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 88. OCDE, Paris.

(4) OCDE (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 54. OCDE, Paris.

(5) Baird, D.J., *et autres* (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. Ecotox. and Environ. Safety, 21, 257-265.

(6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

(7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods

(8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, 775-782.

(9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. In: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 — 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA

(10) Baird, D.J., *et autres* (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.

▼**M7**

(11) Parkhurst, B.R., J.L Forte. et G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26: 1-8.

(12) Cowgill, U.M. et Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120 (2): 185-196.

(13) OCDE (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 23. OCDE, Paris.

(14) Sims, I.R., S. Watson. et D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environ. Toxicol. and Chem., 12, 2053-2058.

(15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.

▼M7

Appendice 1

DÉFINITIONS

Les définitions suivantes sont utilisées dans le cadre de la présente méthode d'essai:

Mortalité accidentelle: mortalité non liée au produit chimique testé, et causée par un incident (c'est-à-dire par une cause connue).

Produit chimique: une substance ou un mélange.

CE_x: concentration du produit chimique d'essai dissous dans l'eau qui entraîne une diminution de x pour cent de la reproduction chez *Daphnia*, durant une période d'exposition définie.

Mortalité fortuite: mortalité non liée au produit chimique testé, et de cause inconnue.

Taux intrinsèque d'accroissement de population: mesure de l'accroissement de la population qui intègre la capacité reproductrice et la mortalité par tranche d'âge (1) (2) (3). Elle est nulle dans les populations à l'état stationnaire, positive dans les populations en croissance et négative dans les populations qui régressent. Cette dernière catégorie de population n'est évidemment pas durable et est vouée en fin de compte à l'extinction.

Limite de détection: la plus basse concentration susceptible d'être détectée, mais non chiffrée.

Limite de détermination: la plus basse concentration susceptible d'être mesurée quantitativement.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): concentration d'essai la plus basse à laquelle on a observé un effet statistiquement significatif du produit chimique sur la reproduction et la mortalité des animaux parents (à $p < 0,05$) par rapport au témoin, durant une période d'exposition définie. Cependant, il convient que toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO produisent un effet nocif supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Si ces deux conditions ne peuvent être remplies, il convient de justifier de façon détaillée le choix de la CMEO (et donc de la CSEO).

Mortalité: un animal est noté comme mort lorsqu'il est immobile, autrement dit lorsqu'il n'est pas capable de nager ou si aucun mouvement des appendices ou du postabdomen n'est observé dans les 15 secondes qui suivent l'agitation douce du récipient d'essai. (Si on utilise une autre définition, il convient que celle-ci soit stipulée avec sa référence).

Concentration (maximale) sans effet observé (CSEO): concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO qui, comparée au témoin, n'a pas d'effet statistiquement significatif (à $p < 0,05$), durant une période d'exposition définie.

Descendants: jeunes *Daphnia* engendrées par les animaux parents au cours de l'essai.

Animaux parents: *Daphnia* femelles présentes au début de l'essai et dont la capacité reproductrice représente l'objet de cette étude.

Taux de reproduction: nombre de descendants vivants issus d'animaux parents pendant la période d'essai.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Wilson, E.O. et Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

▼M7

(2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.

(3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. et Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

▼M7

Appendice 2

PRÉPARATION DE MILIEUX ELENDT M7 ET M4 ENTIÈREMENT DÉFINIS

Acclimatation aux milieux Elendt M7 et M4

Certains laboratoires ont éprouvé des difficultés à transférer directement les *Daphnia* dans les milieux M4 (1) et M7. Ils sont toutefois parvenus à un certain résultat en les acclimatant progressivement, c'est-à-dire en les transférant de leur milieu vers un milieu à 30 pour cent d'Elendt, puis à 60 pour cent d'Elendt et enfin à 100 pour cent d'Elendt. La période d'acclimatation peut prendre jusqu'à un mois.

Préparation

Élements traces

Des solutions mères (I), contenant chacune un seul élément trace, sont tout d'abord préparées avec une eau d'une pureté adéquate, par exemple de l'eau désionisée, distillée ou obtenue par osmose inverse. A partir de ces différentes solutions mères (I), on prépare une deuxième solution mère unique (II) renfermant toutes les éléments traces (solution combinée), à savoir:

Solution(s) mère(s) I (substance unique)	Quantité ajoutée à l'eau	Concentration (par rapport au milieu M4)	Pour préparer la solution mère combinée II, ajouter la quantité suivante de solution mère I à l'eau	
	mg/l		ml/l	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20 000-fois	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	7 210	20 000-fois	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-fois	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000-fois	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3 040	20 000-fois	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-fois	1,0	0,25
Mo $Na_2O_4 \cdot 2\ H_2O$	1 260	20 000-fois	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	335	20 000-fois	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-fois	1,0	1,0
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	20 000-fois	1,0	1,0
KI	65	20 000-fois	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000-fois	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000-fois	1,0	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	5 000	2 000-fois	—	—
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 991	2 000-fois	—	—
Les solutions de Na2EDTA et de FeSO4 sont préparées séparément, puis mélangées et immédiatement autoclavées. Cela donne:				
Solution de Fe-EDTA		1 000-fois	20,0	5,0

▼**M7**

Milieux M4 et M7

Les milieux M4 et M7 sont préparés à partir de la solution mère II, des macronutriments et des vitamines, de la façon suivante:

	Quantité ajoutée à l'eau	Concentration (par rapport au milieu M4)	Quantité de solution mère ajoutée pour préparer le milieu	
	mg/l		ml/l	
			M4	M7
Solution mère II (combinaison de substances en traces)		20-fois	50	50
Solutions mères contenant les macronutriments (une substance par solution)				
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1 000-fois	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	2 000-fois	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-fois	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000-fois	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	5 000-fois	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-fois	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000-fois	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-fois	0,1	0,1
Solution mère de vitamines combinées	—	10 000-fois	0,1	0,1

La solution mère de vitamines combinées est préparée en additionnant 3 vitamines à 1 litre d'eau, comme indiqué ci-dessous:

	mg/l			
Chlorhydrate de thiamine	750	10 000-fois		
Cyanocobalamine (B_{12})	10	10 000-fois		
Biotine	7,5	10 000-fois		

La solution mère de vitamines combinées est congelée par petites parties aliquotes. Les vitamines sont ajoutées au milieu peu avant son utilisation.

N.B.: Afin d'éviter que les sels ne précipitent lorsqu'on prépare le milieu complet, on ajoute les parties aliquotes de solution mère à quelque 500 à 800 ml d'eau désionisée et on amène le volume à un litre.

N.N.B: La première publication relative au milieu M4 se trouve dans Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M7

Appendice 3

ANALYSE DE LA TENEUR EN CARBONE ORGANIQUE TOTAL (COT) ET ÉTABLISSEMENT D'UN NOMOGRAMME POUR LA TENEUR EN COT DANS LES ALIMENTS À BASE D'ALGUES

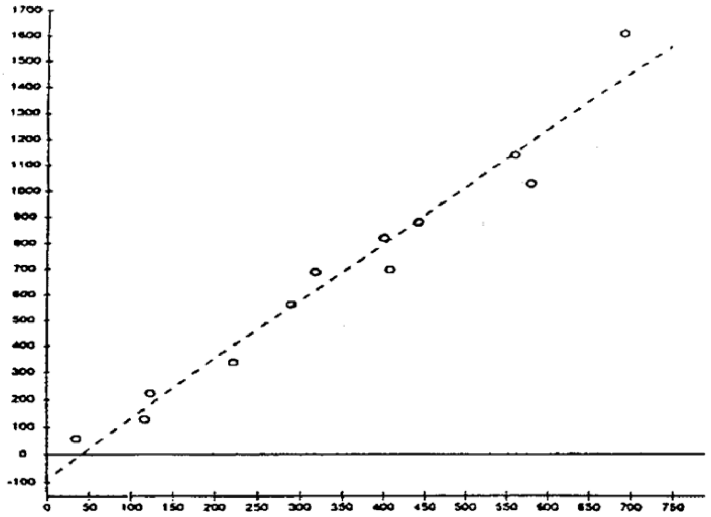
Il est admis que la teneur en carbone des algues alimentaires n'est généralement pas mesurée directement, mais déduite de corrélations (par nomogramme) avec des paramètres de remplacement, comme le nombre de cellules d'algues ou l'absorbance de la lumière.

Il faudrait mesurer le COT par oxydation à haute température plutôt que par les méthodes aux UV ou au persulfate. (Pour s'orienter voir: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Pour établir le nomogramme, il y a lieu d'isoler les algues du milieu de croissance par une centrifugation suivie d'une remise en suspension dans de l'eau distillée. On mesure le paramètre de remplacement et la teneur en COT dans chaque échantillon, produit en triple exemplaire. Les témoins contenant uniquement de l'eau distillée devraient être analysés et la teneur en COT déduite de celle de l'échantillon contenant les algues.

Les nomogrammes devraient être linéaires sur la gamme de teneurs en carbone utilisée. Des exemples sont présentés ci-dessous.

N.B. Ces exemples ne doivent pas être utilisés pour les conversions; il est indispensable que les laboratoires établissent leurs propres nomogrammes.



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

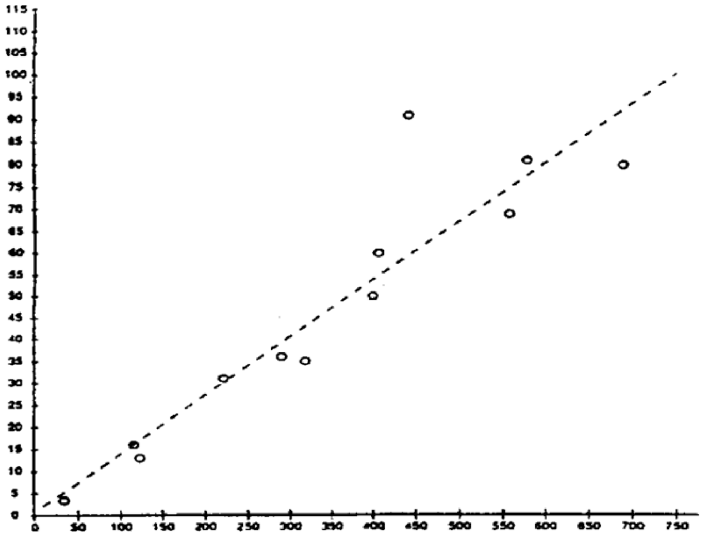
Régression des mg/l de poids sec en fonction des mg de C/l. Données provenant de suspensions concentrées de cultures semi-continues de cellules, remises en suspension dans de l'eau distillée.

Axe des x: mg de C/l d'algues alimentaires concentrées

Axe des y: mg/l de poids sec d'algues alimentaires concentrées

Coefficient de corrélation – 0,980

▼**M7**



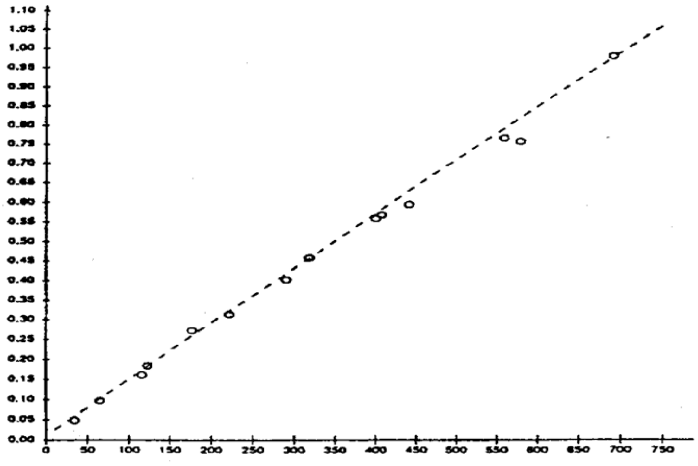
Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Régression du nombre de cellules en fonction des mg de C/1. Données provenant de suspensions concentrées de cultures semi-continues de cellules, remises en suspension dans de l'eau distillées.

Axe des x: mg de C/1d'algues alimentaires concentrées

Axe de y: nombre de cellules/1 d'algues alimentaires concentrées

Coefficient de corrélation – 0,926



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Régression de l'absorbance en fonction des mg de C/1 (longueur du trajet optique: 1 cm). Données provenant de suspensions concentrées de cultures semi-continues de cellules, remises en suspension dans de l'eau distillée.

Axe des x: mg de C/1d'algues alimentaires concentrées

Axe des y: Absorbance à 440 nm dans une dilution à 1/10 d'une solution d'algues alimentaires concentrées

Coefficient de corrélation – 0,998

▼M7

Appendice 4

EXEMPLE DE FICHE POUR CONSIGNER LE RENOUVELLEMENT DU MILIEU, LES DONNÉES DE SURVEILLANCE PHYSICO-CHIMIQUE, L'ALIMENTATION, LA REPRODUCTION DES DAPHNIES ET LA MORTALITÉ DES PARENTS

Expérience n°:	Date de début:						Clone:			Milieu:				Type d'alimentation:				Produit chimique d'essai:					Concentration nominale:	
Jour	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Renouvellement du milieu (cocher)																								
pH (*)																							nouveau	
																							ancien	
O_2 (mg/l) (*)																							nouveau	
																							ancien	
Temp (°C) (*)																							nouveau	
																							ancien	
Alimentation fournie (cocher)																								
Nbre descendants vivants (**)																								Total
Récipient 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

02008R0440 — FR — 16.10.2019 — 008.001 — 1825

▼M7

Expérience n°:	Date de début:						Clone:			Milieu:				Type d'alimentation:				Produit chimique d'essai:					Concentration nominale:	
Jour	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Total	
Mortalité cumulée des parents (***)																								

(*) Indiquer quel récipient a été utilisé pour l'essai
(**) Indiquer les portées avortées par les lettres «AB» dans la case appropriée
(***) Indiquer la mortalité d'un quelconque animal parent par la lettre «M» dans la case appropriée

▼**M7**

Appendice 5

EXEMPLE DE FICHE DE DONNÉES POUR CONSIGNER LES RÉSULTATS DE L'ANALYSE CHIMIQUE

(a) **Concentrations mesurées**

Concentration nominale	échantillon prélevé durant la première semaine		échantillon prélevé durant la deuxième semaine		échantillon prélevé durant la troisième semaine	
	après renouvellement	avant renouvellement	après renouvellement	avant renouvellement	après renouvellement	avant renouvellement

(b) **Concentrations mesurées en pourcentage de la concentration nominale**

Concentration nominale	échantillon prélevé durant la première semaine		échantillon prélevé durant la deuxième semaine		échantillon prélevé durant la troisième semaine	
	après renouvellement	avant renouvellement	après renouvellement	avant renouvellement	après renouvellement	avant renouvellement

▼M7

Appendice 6

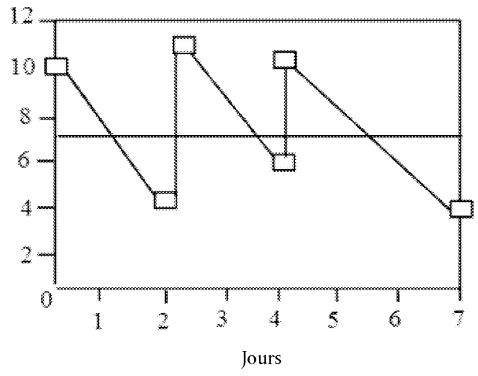
CALCUL D'UNE MOYENNE PONDEREE SUR LE TEMPS

Moyenne pondérée sur le [en fonction du] temps

Etant donné que la concentration du produit chimique d'essai peut diminuer au cours de la période comprise entre les renouvellements du milieu, il est nécessaire de rechercher la concentration qui devrait être considérée comme représentative de la gamme de concentrations que subissent les Daphnia parents. Le choix devrait s'appuyer sur des considérations biologiques aussi bien que statistiques. Si on estime, par exemple, que la reproduction est surtout affectée par la concentration maximale, il convient d'utiliser la concentration maximale. Si, par contre, on juge que c'est l'effet cumulé ou à long terme du produit chimique toxique qui est prépondérant, il est plus pertinent de prendre une concentration moyenne. Dans ce cas, la concentration moyenne pondérée sur le temps convient, puisqu'elle tient compte de la variation de la concentration instantanée en fonction du temps.

Figure 1

Exemple de moyenne pondérée sur le [en fonction] du temps



La figure 1 illustre un essai (simplifié) qui dure sept jours et dans lequel le milieu est renouvelé aux jours 0, 2 et 4.

— La ligne fine en zigzag représente la concentration en fonction du temps. La chute de concentration est supposée suivre une évolution exponentielle.

— Les six points portés sur le graphique représentent les concentrations observées mesurées au début et à la fin de chaque période de renouvellement.

— La ligne épaisse indique la position de la moyenne pondérée sur le temps.

La moyenne pondérée sur le temps est calculée de façon que la superficie comprise en dessous de la moyenne pondérée en fonction du temps soit égale à la superficie située en dessous de la courbe de concentration. Le calcul correspondant à l'exemple figurant ci-dessus est illustré au tableau 1.

Tableau 1

Calcul de la moyenne pondérée en fonction du temps

Renouvel-lement n°	Jours	Conc 0	Conc 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Superficie
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781

▼**M7**

Renouvel-lement nº	Jours	Conc 0	Conc 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Superficie
Nombre total de jours:	7				Superficie totale:	50,092
					Moyenne PT:	7,156

Jours correspond au nombre de jours de la période de renouvellement

Conc 0 est la concentration mesurée au début de chaque période de renouvellement

Conc 1 est la concentration mesurée à la fin de chaque période de renouvellement

Ln(Conc 0) est le logarithme népérien de Conc 0

Ln(Conc 1) est le logarithme népérien de Conc 1

La *superficie* est celle comprise en dessous de la courbe exponentielle de chaque période de renouvellement. Elle se calcule par la formule suivante:

$$Superficie = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times Jours$$

La moyenne pondérée sur le temps (*moyenne PT*) est la *superficie* totale divisée par le *nombre total de jours*.

Bien entendu, dans le cas de l'essai de reproduction chez *Daphnia*, le tableau devrait être étendu à 21 jours.

Il est clair que lorsque les observations ne sont faites qu'au début et à la fin de chaque période de renouvellement, il n'est pas possible d'affirmer avec certitude que la chute de concentration est effectivement exponentielle. Une courbe différente donnerait lieu à un calcul différent de la *superficie.* Cependant, une chute de concentration exponentielle est plausible et constitue probablement la meilleure courbe à utiliser en l'absence d'autres informations.

Il convient toutefois d'être prudent si l'analyse chimique ne détecte aucun produit chimique à la fin de la période de renouvellement. Tant qu'il n'est pas possible d'estimer la vitesse de disparition du produit chimique dans la solution, il est impossible d'obtenir une superficie réaliste sous la courbe et, partant, une moyenne pondérée sur le temps qui soit raisonnable.

▼M7

Appendice 7

GUIDE POUR L'IDENTIFICATION DU SEXE DES NOUVEAUX-NÉS

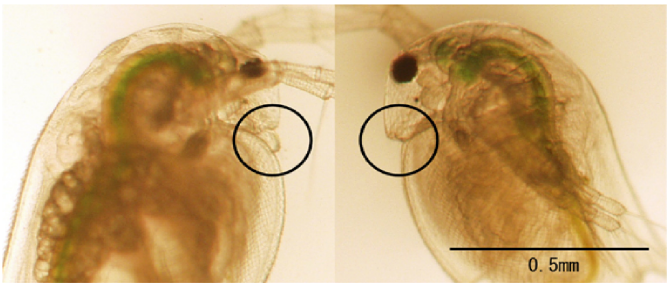
La production de mâles parmi les descendants peut avoir lieu sous certaines conditions environnementales changeantes, telles qu'un raccourcissement de la photopériode, des variations de températures, une diminution de la concentration en nourriture, et une densité de population accrue (Hobaek and Larson, 1990; Kleiven et al, 1992). La production de mâles est aussi connue comme une réponse à certains régulateurs de croissance d'insectes (Oda et al, 2005). Dans des conditions où les facteurs de stress chimiques induisent une diminution des descendants issus de femelles parthénogéniques, un nombre accru de mâles serait attendu (OECD, 2008). Sur la base des informations disponibles, il n'est pas possible de prédire, entre le sexe des descendants ou l'effet sur la reproduction, laquelle de ces mesures sera la plus sensible; cependant il existe des indications (OECD, 2008) tendant à montrer que l'induction de mâles dans la descendance pourrait être moins sensible que le nombre de descendants. Puisque l'objectif principal de la méthode d'essai est d'évaluer le nombre de descendants produits, l'apparation de mâle dans cette descendance est une observation optionnelle. Si cette mesure optionnelle est évaluée dans une étude, alors il convient d'appliquer un critère de validité supplémentaire aux témoins: les témoins ne contiennent pas plus de 5 % de descendants mâles.

La manière la plus pratique et la plus aisée de différencier le sexe des daphnies est d'utiliser leurs caractéristiques phénotypiques, puisque les mâles et les femelles sont génétiquement identiques et leur sexe est déterminé par les conditions environnementales. Les mâles et les femelles diffèrent par leur longueur et par la morphologie de leurs premières antennes qui sont plus longues chez les mâles que chez les femelles (figure 1). Cette différence est reconnaissable dès la naissance, bien que d'autres caractéristiques sexuelles secondaires se développent à mesure que les animaux grandissent (voir figure 2 dans Olmstead et Leblanc, 2000).

Afin d'observer le sexe morphologique, les descendants produits par chaque parent sont transférés au moyen d'une pipette et placés dans une boîte de pétri content le milieu d'essai. Le milieu d'essai est maintenu au minimum pour minimiser les mouvements des animaux. L'observation de la première antenne peut être effectuée sous un stéréomicroscope (x10-60).

Figure. 1

mâle (à gauche) et femelle (à droite) de *D. magna* agés de 24 heures. Les mâles peuvent se distinguer des femelles par la longueur et la morphologie de leur première paire d'antennes, comme indiqué dans le cercle (Tatarazako et al., 2004).



BIBLIOGRAPHIE

Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197-206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168-1174.

▼**M7**

OCDE, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna r*eproduction test. Série sur les essais et l'évaluation, n° 88. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 19:2107-2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Environmental Science 17, 439-449.

▼B

C.21. MICRO-ORGANISMES DU SOL: ESSAI DE TRANSFORMATION DE L'AZOTE

1. MÉTHODE

La présente méthode d'essai reprend l'essai TG 216 (2000) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode d'essai décrit une méthode de laboratoire conçue pour étudier les effets à long terme des substances chimiques, après une exposition unique, sur l'activité de transformation de l'azote par les micro-organismes du sol. L'essai s'appuie principalement sur les recommandations de l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (1). Toutefois, d'autres lignes directrices, notamment celles du Biologische Bundesanstalt allemand (2), de l'agence de protection de l'environnement des États-Unis (3) de la SETAC (4) et de l'Organisation internationale de normalisation (ISO) (5), ont également été prises en considération. Lors d'un atelier de l'OCDE sur la sélection des sols et des sédiments, qui s'est tenu à Belgirate, Italie, en 1995 (6), le nombre et le type de sols à utiliser dans le cadre de cet essai ont été définis. Les recommandations relatives au prélèvement, à la manipulation et au stockage des échantillons de sol s'appuient sur des lignes directrices de l'ISO (7) et sur les recommandations de l'atelier de Belgirate. Pour déterminer et évaluer les caractéristiques toxiques des substances d'essai, il peut être nécessaire de déterminer leurs effets sur l'activité microbienne du sol, par exemple lorsqu'il est nécessaire de disposer de données sur les effets secondaires potentiels des produits phytosanitaires sur la microflore du sol ou bien en cas de risque d'exposition des micro-organismes du sol à des substances chimiques autres que les produits phytosanitaires. L'essai de transformation de l'azote est effectué pour déterminer les effets de ces substances chimiques sur la microflore du sol. Si l'essai porte sur des produits agrochimiques (produits phytosanitaires, engrais, produits chimiques sylvicoles), deux essais sont effectués: l'essai de transformation de l'azote et l'essai de transformation du carbone. S'il s'agit d'autres substances que les produits agrochimiques, l'essai de transformation de l'azote suffit. Toutefois, si les valeurs CE_{50} de l'essai de transformation de l'azote relatives à ces substances chimiques correspondent à celles des inhibiteurs de la nitrification commerciaux (nitrapyrine), un essai de transformation du carbone peut être effectué afin d'obtenir des informations complémentaires.

Les sols sont formés de composés vivants et non vivants qui existent sous forme de mélanges complexes et hétérogènes. Les micro-organismes jouent un rôle important dans la décomposition et la transformation de la matière organique en sol fertile et un grand nombre d'espèces contribuent aux différents aspects de la fertilisation des sols. Toute interférence à long terme avec ces processus biochimiques risque de perturber le cycle des éléments nutritifs et par conséquent d'altérer la fertilité du sol. La transformation du carbone et de l'azote se produit dans tous les sols fertiles. Bien que les colonies microbiennes responsables de ces processus diffèrent d'un sol à un autre, les voies de transformation sont identiques pour l'essentiel.

La méthode d'essai décrite ici est conçue pour détecter les effets nocifs à long terme d'une substance sur le processus de transformation de l'azote à la surface aérobie des sols. La méthode d'essai permet également d'estimer les effets des substances sur la transformation du carbone par la microflore du sol. La formation de nitrate se produit par suite de la dégradation des liaisons carbone-azote. Par conséquent, si l'on trouve des taux identiques de production de nitrate dans des sols traités et dans les sols témoins, il est très probable que les voies de dégradation principales du carbone soient intactes et fonctionnelles. Le substrat choisi pour l'essai (farine de luzerne en poudre) présente un bon rapport carbone-azote (généralement entre 12/1 et 16/1). De ce fait, la carence en carbone est réduite pendant l'essai et si la population microbienne est endommagée par une substance chimique, elle peut se reconstituer dans un délai de 100 jours.

▼B

Les essais à partir desquels la présente méthode d'essai a été mise au point étaient conçus avant tout pour des substances dont il est possible d'estimer la quantité qui pénètre dans le sol. C'est le cas par exemple, des produits phytosanitaires dont la dose d'application dans le champ est connue. Pour les produits agrochimiques, il suffit de pratiquer un essai sur deux doses correspondant au taux d'application prévu ou estimé. Les produits agrochimiques peuvent être testés sous forme de principes actifs (p.a.) ou de produits formulés. Toutefois, l'essai n'est pas limité aux produits agrochimiques. En modifiant la quantité de substance-d'essai appliquée au sol, et le mode d'évaluation des données, on détermine les effets d'une série de concentrations sur la transformation de l'azote pour les substances chimiques autres que les produits agrochimiques L'essai peut également être utilisé pour les substances chimiques dont on ne connaît pas la quantité qui pénètre dans le sol.. Les résultats de ces essais sont utilisés pour préparer une courbe dose-réponse et calculer les valeurs CE_x, où x est défini comme le pourcentage d'effet.

1.2. DÉFINITIONS

Transformation de l'azote: dégradation par des micro-organismes de la matière organique contenant de l'azote, par le processus d'ammonification et de nitrification, en son produit final, le nitrate inorganique.

CE_x (concentration produisant x % d'effet): concentration de la substance d'essai dans le sol qui produit x pour cent d'inhibition de la transformation de l'azote en nitrate.

CE_{50} (concentration produisant 50 % d'effet): concentration de la substance d'essai dans le sol qui produit 50 pour cent (50 %) d'inhibition de la transformation de l'azote en nitrate.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le sol tamisé est amendé avec de la farine végétale en poudre puis traité avec la substance d'essai ou laissé non traité (témoin). Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, il est recommandé d'utiliser au moins deux concentrations d'essai et celles-ci doivent être choisies en fonction de la concentration maximale prévisible dans le champ. Au bout de 0, 7, 14 et 28 jours d'incubation, des échantillons de sol traité et des échantillons témoins sont extraits avec un solvant approprié, et les quantités de nitrate présentes dans les extraits sont déterminées. Le taux de formation de nitrate dans les échantillons traités est comparé au taux des échantillons témoins, et l'écart en pourcentage entre l'échantillon traité et l'échantillon témoin est calculé. Tous les essais durent au moins 28 jours. Si, au 28^{e} jour, les différences entre les sols traités et les sols non traités sont égales ou supérieures à 25 %, les mesures sont poursuivies pendant une durée maximale de 100 jours. Lorsque l'essai porte sur des produits non agrochimiques, une série de concentrations de substance d'essai sont ajoutées aux échantillons de sol, et les quantités de nitrate formées dans les échantillons traités et les échantillons témoins sont mesurées au bout de 28 jours d'incubation. Les résultats des essais avec une série de concentrations sont analysés à l'aide d'un modèle de régression, et les valeurs CE_x sont calculées (CE_{50}, CE_{25} et/ou CE_{10}). Voir définitions.

1.5. VALIDITÉ DE L'ESSAI

L'évaluation des résultats des essais effectués avec des produits agrochimiques repose sur des différences relativement faibles (valeur moyenne ± 25 %) entre les concentrations en nitrate dans les échantillons témoins et les échantillons traités, de sorte qu'une variabilité importante des témoins peut entraîner des résultats erronés. C'est pourquoi la variation entre les témoins doit être inférieure à ± 15 %.

▼B

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Appareillage**

Des récipients d'essai en matériau chimiquement inerte sont utilisés. Ces récipients doivent avoir une contenance adaptée à la méthode d'incubation utilisée, c'est-à-dire: incubation en vrac ou avec une série d'échantillons individuels (voir le paragraphe 1.7.1.2). Il convient de veiller à la fois à minimiser l'évaporation et à permettre l'échangé gazeux pendant l'essai (les récipients d'essai peuvent par exemple être couverts d'une feuille de polyéthylène perforée). Lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, il convient d'utiliser des récipients hermétiques et étanches au gaz. La taille de ces récipients doit être telle qu'ils soient remplis environ au quart de leur contenance avec l'échantillon de sol.

Le matériel courant de laboratoire suivant est utilisé:

— agitateur: agitateur mécanique ou équivalent;

— centrifugeuse (3 000 g) ou appareil de filtration (avec du papier filtre sans nitrate);

— instrument de sensibilité et de reproductibilité adapté à l'analyse des nitrates.

1.6.2. **Sélection et nombre de sols**

Un seul sol est utilisé. Les caractéristiques recommandées sont les suivantes:

— teneur en sable: supérieure à 50 % et inférieure à 75 %,

— pH: 5,5 - 7,5,

— teneur en carbone organique: 0,5 — 1,5 %,

— la biomasse microbienne doit être mesurée (8) (9) et sa teneur en carbone doit être égale à 1 % au moins du carbone organique total du sol.

Dans la plupart des cas, un sol possédant ces caractéristiques représente les conditions les plus défavorables, puisque l'adsorption de la substance chimique de l'essai est minimale et que l'exposition de la microflore est maximale. Il est donc généralement inutile d'effectuer des essais avec d'autres sols. Toutefois, dans certains cas, par exemple lorsque l'utilisation principale prévue de la substance d'essai concerne des sols particuliers comme les sols forestiers acides, ou dans le cas de substances chimiques chargées électrostatiquement, il peut être nécessaire d'utiliser un sol différent.

▼B

1.6.3. **Prélèvement et stockage des échantillons de sol**

1.6.3.1. *Prélèvement*

Il est nécessaire de fournir des informations détaillées sur l'historique du site de prélèvement. Ces détails doivent comprendre la localisation exacte, le couvert végétal, les dates de traitement aux produits phytosanitaires, les traitements aux engrais organiques et inorganiques, les apports biologiques ou les contaminations accidentelles. Le site choisi pour le prélèvement de sol doit être de nature à permettre une utilisation de longue durée. Les pâturages permanents, les champs plantés de céréales annuelles (à l'exception du maïs) ou à ensemencement dense en engrais verts conviennent. Le site de prélèvement retenu ne doit pas avoir été traité avec des produits phytosanitaires pendant un an au moins avant le prélèvement des échantillons. De même, aucun engrais organique ne doit avoir été appliqué pendant au moins six mois. L'utilisation d'engrais minéraux est acceptable uniquement si elle satisfait aux exigences de la culture et aucun échantillon de sol ne doit être prélevé que trois mois au moins après l'application d'engrais. L'utilisation de sol traité avec des engrais ayant des effets biocides connus (comme le cyanamide calcique) doit être évitée.

Il convient d'éviter de prélever des échantillons pendant ou immédiatement après de longues périodes (plus de 30 jours) de sécheresse ou de saturation en eau. En ce qui concerne les sols labourés, les échantillons doivent être prélevés à une profondeur de 0 à 20 cm. En ce qui concerne les herbages (pâture) ou les sols qui ne sont pas labourés pendant de longues périodes (au moins une période végétative), la profondeur maximale du prélèvement peut être légèrement supérieure à 20 cm (25 cm par exemple).

Les échantillons de sol doivent être transportés dans des récipients et dans des conditions de température de nature à garantir que les propriétés initiales du sol ne soient pas altérées de manière significative.

1.6.3.2. *Stockage*

Il est préférable d'utiliser des sols qui viennent d'être extraits du site. S'il n'est pas possible d'éviter le stockage dans le laboratoire, les sols peuvent être entreposés dans le noir à 4 ± 2 ^{o}C pendant une durée maximale de trois mois. Pendant la durée de stockage des sols, des conditions aérobies doivent être assurées. Si les sols sont prélevés dans une zone où il gèle au moins trois mois par an, il peut être envisagé de stocker le sol pendant six mois entre moins 18 ^{o}C et moins 22 ^{o}C. La biomasse microbienne des sols stockés est mesurée avant chaque expérience et le carbone présent dans la biomasse doit être égal à 1 % au moins de la teneur totale en carbone organique du sol (voir le paragraphe 1.6.2).

1.6.4 **Manipulation et préparation du sol pour l'essai**

1.6.4.1 *Pré-incubation*

Si le sol a été stocké (voir le paragraphe 1.6.3.2), il est recommandé de procéder à une pré-incubation pendant 2 à 28 jours. La température et la teneur en eau du sol pendant la pré-incubation doivent être les mêmes que celles utilisées pendant l'essai (voir les paragraphes 1.6.4.2 et 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2 *Propriétés physico-chimiques*

Le sol est débarrassé manuellement des gros objets (pierres, débris végétaux, etc.) puis tamisé humide sans séchage excessif jusqu'à obtention d'une granulométrie inférieure ou égale à 2 mm. La teneur en eau de l'échantillon de sol doit être ajustée avec de l'eau distillée ou désionisée à une valeur située entre 40 % et 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau.

1.6.4.3 *Amendement à l'aide d'un substrat organique*

Le sol doit être amendé à l'aide d'un substrat organique approprié, comme de la farine de luzerne verte en poudre (composant principal: *Medicago sativa*) avec un rapport C/N situé entre 12/1 et 16/1. Le rapport luzerne-sol recommandé est de 5 g de luzerne par kilogramme de sol (poids sec).

1.6.5 **Préparation de la substance d'essai à appliquer au sol**

La substance d'essai est généralement appliquée à l'aide d'un excipient. L'excipient peut être de l'eau (pour les substances solubles dans l'eau) ou un solide inerte comme du sable de quartz fin (granulométrie: 0,1 - 0,5mm). Il convient d'éviter les excipients liquides autres que l'eau (solvants organiques tels que l'acétone ou le chloroforme) car ils peuvent endommager la microflore. Si l'on utilise du sable comme excipient, celui-ci peut être traité par la substance d'essai dissoute ou en suspension dans un solvant approprié. Dans ce cas, le solvant doit être éliminé par évaporation avant de mélanger l'excipient avec le sol. Pour obtenir une répartition optimale de la substance d'essai dans le sol, un rapport de 10 g de sable par kilogramme de sol (poids sec) est recommandé. Les échantillons témoins sont traités avec une quantité équivalente d'eau et/ou de sable de quartz uniquement.

Lorsque l'on teste des substances chimiques volatiles, il convient d'éviter dans la mesure du possible les pertes pendant le traitement et il convient d'essayer de veiller à la répartition homogène dans l'échantillon de sol (la substance d'essai doit être injectée dans le sol en plusieurs endroits).

1.6.6 **Concentrations d'essai**

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, il convient d'utiliser au moins deux concentrations. La concentration la plus faible doit correspondre au moins à la quantité maximale susceptible de pénétrer dans le sol dans des conditions réelles alors que la concentration la plus élevée doit être un multiple de la concentration la plus faible. Les concentrations de substance d'essai ajoutées au sol sont calculées en supposant une incorporation uniforme à une profondeur de 5 cm et une densité apparente du sol de 1,5. Dans le cas des produits agrochimiques appliqués directement sur le sol, ou des substances chimiques dont on peut prévoir la quantité qui pénètre dans le sol, les concentrations d'essai recommandées sont égales à la concentration maximale prévisible dans l'environnement (CPE) et cinq fois cette concentration. Les substances qui doivent être appliquées sur le sol plusieurs fois au cours d'une même saison doivent être testées à des concentrations calculées en multipliant la CPE par le nombre maximal d'applications prévu. La concentration la plus élevée testée ne doit toutefois pas dépasser dix fois la dose maximale d'une application. Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, une série géométrique de cinq concentrations au moins est utilisée. Les concentrations testées doivent couvrir la gamme nécessaire pour déterminer les valeurs CE_x.

▼B

1.7. EXÉCUTION DE L'ESSAI

1.7.1. **Conditions expérimentales**

1.7.1.1. *Traitement et contrôle*

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, le sol est divisé en trois fractions de poids égal. Deux fractions sont mélangées à l'excipient contenant le produit, et la troisième avec l'excipient sans produit (témoin). Il est recommandé de préparer un minimum de trois réplicats de sol traité et non traité. Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, le sol est divisé en six fractions de poids égal. Cinq échantillons sont mélangés avec l'excipient contenant la substance d'essai, et le sixième est mélangé avec l'excipient sans la substance chimique. Il est recommandé de préparer trois réplicats de sol traité et de témoins. Il convient de veiller à la répartition homogène de la substance d'essai dans les échantillons de sol traité. Pendant le mélange, il convient d'éviter la compression ou le compactage de l'échantillon de sol.

1.7.1.2. *Incubation des échantillons de sol*

L'incubation des échantillons de sol peut être effectuée de deux façons: sous forme d'échantillons en vrac de sol traité et de sol non traité ou sous forme d'une série de sous-échantillons individuels et de taille identique de chaque sol traité et non traité. Toutefois, lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, l'essai doit être effectué uniquement avec une série de sous-échantillons individuels. Lorsque les sols sont incubés en vrac, de grandes quantités de chaque sol traité et non traité sont préparées et les sous-échantillons à analyser sont prélevés en fonction des besoins pendant l'essai. La quantité préparée initialement pour chaque traitement et pour le contrôle dépend de la taille des sous-échantillons, du nombre de réplicats utilisés pour l'analyse et du nombre maximal de temps de prélèvement. Les sols incubés en vrac doivent être soigneusement mélangés avant de procéder au sous-échantillonnage. Lorsque les sols sont incubés sous forme d'échantillons individuels, on divise chaque sol en vrac traité et non traité dans le nombre requis de sous-échantillons, et ceux-ci sont utilisés selon les besoins. Dans les expériences où l'on peut prévoir plus de deux temps de prélèvement, une quantité suffisante de sous-échantillons doit être préparée pour tenir compte de tous les réplicats et de tous les temps de prélèvement. Au moins trois exemplaires d'échantillons du sol d'essai doivent être incubés en milieu aérobie (voir le paragraphe 1.7.1.1). Pendant tous les essais, il convient d'utiliser des récipients appropriés comportant-un espace libre suffisant afin d'éviter le développement de conditions anaérobies. Lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, il doit être effectué uniquement avec une série de sous-échantillons individuels.

1.7.1.3. *Conditions et durée de l'essai*

L'essai est effectué dans le noir à température ambiante de 20 ± 2 °C. Pendant l'essai, la teneur en eau des échantillons de sol doit être maintenue entre 40 % et 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau du sol (voir le paragraphe 1.6.4.2) avec une marge de ± 5 %. De l'eau distillée, désionisée peut être ajoutée si nécessaire.

La durée minimale de l'essai est de 28 jours. Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, on compare les taux de formation de nitrate dans les échantillons traités et dans les échantillons témoins. Si ceux-ci diffèrent de plus de 25 % au jour 28, on poursuit l'essai jusqu'à obtenir une différence égale ou inférieure à 25 %, ou pendant une durée maximale de 100 jours. En ce qui concerne les produits non agrochimiques, l'essai est arrêté au bout de 28 jours. Au jour 28, les quantités de nitrate dans les échantillons traités et les échantillons témoins sont déterminées et les valeurs CE_x sont calculées.

▼B

1.7.2. **Prélèvement et analyse des sols**

1.7.2.1. *Échelonnement des prélèvements*

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, les échantillons de sol font l'objet d'une analyse de mesure du nitrate aux jours 0, 7, 14 et 28. S'il est nécessaire de prolonger l'essai, de nouvelles mesures doivent être effectuées tous les 14 jours après le jour 28.

Lorsque l'essai porte sur des produits non agrochimiques, au moins cinq concentrations d'essai sont utilisées et les échantillons de sol sont analysés pour mesurer le nitrate au début (jour 0) et à la fin de la période d'exposition (28 jours). Une mesure intermédiaire, par exemple au jour 7, peut être ajoutée si nécessaire. Les données obtenues au jour 28 sont utilisées pour déterminer la valeur CE_x de la substance chimique. Si on le souhaite, on peut utiliser les données des témoins du jour 0 afin de mesurer la quantité initiale de nitrate dans le sol.

1.7.2.2. *Analyse des échantillons de sol*

La quantité de nitrate formé dans chaque échantillon traité et dans chaque témoin est déterminée à chaque temps de prélèvement. Le nitrate est extrait du sol en agitant les échantillons en présence d'un solvant d'extraction, par exemple, une solution de 0,1 M de chlorure de potassium. Un rapport de 5 ml de solution de KCl par gramme d'équivalent poids sec de sol est recommandé. Afin d'optimiser l'extraction, les récipients contenant le sol et la solution d'extraction ne doivent pas être remplis à plus de la moitié de leur contenance. Les mélanges sont agités à 150 tpm pendant 60 minutes. Les mélanges sont centrifugés ou filtrés et les phases liquides sont analysées pour mesurer le nitrate. Les extraits liquides débarrassés de particules peuvent être stockés à moins 20 ± 5 °C pendant une durée pouvant aller jusqu'à six mois avant d'être analysés.

2. **DONNÉES**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, la quantité de nitrate formé dans chaque échantillon de sol doit être enregistrée, et les valeurs moyennes de tous les réplicats doivent être présentées sous forme de tableau. Les taux de transformation de l'azote doivent être évalués à l'aide de méthodes statistiques appropriées et généralement reconnues (F-test, seuil de signification de 5 %). Les quantités de nitrate formé sont exprimées en mg nitrate/kg poids sec/jour. On compare le taux de formation de nitrate dans chaque échantillon traité avec le taux dans le témoin, et on calcule l'écart en pourcentage par rapport au témoin.

Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, la quantité de nitrate formé dans chaque réplicat est déterminée, et une courbe dose-réponse est établie pour déterminer les valeurs CE_x. Les quantités de nitrate (mg nitrate/kg poids sec de sol) trouvées dans les échantillons traités au bout de 28 jours sont comparées aux quantités observées dans les échantillons témoins. À partir de ces résultats, on calcule le pourcentage des valeurs d'inhibition pour chaque concentration d'essai. Une courbe de pourcentages en fonction de la concentration est établie, et on utilise ensuite une méthode statistique pour calculer les valeurs CE_x. Les seuils de confiance ($p = 0,95$) des CE_x calculées sont également déterminés à l'aide des méthodes standards (10) (11) (12).

Les substances d'essai qui contiennent d'importantes quantités d'azote peuvent être à l'origine des quantités de nitrate qui se forment pendant l'essai. Si ces substances sont testées à une concentration élevée (par exemple, dans le cas des substances chimiques destinées à être utilisées en applications répétées), des contrôles appropriés doivent être prévus dans l'essai (sol plus substance d'essai mais sans farine végétale). Les résultats de ces contrôles doivent être pris en compte dans le calcul des valeurs CE_x.

▼B

2.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Lorsqu'on évalue les résultats d'essais avec des produits agrochimiques, et que la différence de taux de formation de nitrate entre l'échantillon le moins traité (concentration maximale prévisible) et le témoin est égale ou inférieure à 25 % quel que soit le temps de prélèvement après le jour 28, le produit peut être considéré comme n'ayant aucune influence à long terme sur la transformation de l'azote dans le sol. Lorsqu'on évalue les résultats d'essais avec des substances chimiques autres que les produits agrochimiques, on utilise les valeurs CE_{50}, CE_{25} et/ou CE_{10}.

3. **RAPPORT D'ESSAI**

Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes:

Identification complète du sol utilisé à savoir:

— coordonnées géographiques du site (latitude, longitude),

— information sur l'historique du site (couvert végétal, traitement aux produits phytosanitaires, traitement aux engrais, contamination accidentelle, etc.),

— type d'utilisation (sol agricole, forestier, etc.),

— profondeur du prélèvement (cm),

— teneur en sable/limon/argile (% poids sec),

— valeurs du pH (dans l'eau),

— teneur en carbone organique (% poids sec),

— teneur en azote (% poids sec),

— concentration initiale en nitrate (mg nitrate/kg poids sec),

— capacité d'échange cationique (mmol/kg),

— biomasse microbienne en pourcentage du carbone organique total,

— référence des méthodes utilisées pour la détermination de chaque paramètre,

— toutes les informations relatives au prélèvement et au stockage des échantillons de sol,

— détails de la pré-incubation du sol s'il y a lieu.

Substance d'essai:

— nature physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques,

— données d'identification des substances chimiques, s'il y a lieu, comprenant la formule structurale, la pureté (pour les produits phytosanitaires, le pourcentage de produit actif), la teneur en azote.

Substrat:

— source du substrat,

— composition (farine de luzerne, farine de luzerne verte),

— teneur en carbone, azote (% poids sec),

— taille du tamis (mm).

▼B

Conditions de l'essai:

— détails de la modification du sol avec un substrat organique,

— nombre de concentrations de la substance d'essai utilisée et, le cas échéant, justification des concentrations sélectionnées,

— procédure d'application de la substance d'essai au sol,

— température d'incubation,

— teneur en eau du sol au début et pendant le déroulement de l'essai,

— méthode d'incubation du sol utilisée (en vrac ou en série de sous-échantillons individuels),

— nombre de réplicats,

— temps de prélèvement,

— méthode utilisée pour l'extraction du nitrate du sol.

Résultats:

— procédure analytique et matériel utilisé pour analyser le nitrate,

— tableaux indiquant les valeurs individuelles et moyennes des mesures du nitrate,

— variation entre réplicats dans les échantillons traités et dans les échantillons témoins,

— explications des corrections apportées aux calculs, le cas échéant,

— la variation en pourcentage des taux de formation de nitrate à chaque temps de prélèvement ou, le cas échéant, la valeur CE_{50} avec une limite de confiance de 95 pour cent, les autres valeurs CE_x (CE_{25} ou CE_{10}) avec des intervalles de confiance, et un graphique de la courbe dose-réponse,

— traitement statistique des résultats,

— toutes informations et observations utiles pour l'interprétation des résultats.

4 **RÉFÉRENCES**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24, p. 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

(4) SET AC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Bruxelles.

(5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality — Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality - Biological Methods*.

▼B

(6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italie, p. 18-20, January 1995.

(7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(10) Litchfield, J.T. and WUcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol, and Exper. Ther., 96, p. 99-113.

(11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.22. MICRO-ORGANISMES DU SOL: ESSAI DE TRANSFORMATION DU CARBONE

1. MÉTHODE

La présente méthode d'essai reprend l'essai TG 217 (2000) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode d'essai décrit une méthode de laboratoire conçue pour étudier les effets à long terme des substances chimiques, après une exposition unique, sur l'activité de transformation du carbone par les micro-organismes du sol. L'essai s'appuie principalement sur les recommandations de l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (1). Toutefois, d'autres lignes directrices, notamment celles du Biologische Bundesaristalt allemand (2), de l'agence de protection de l'environnement des États-Unis (3) et de la SETAC (4), ont également été prises en considération. Lors d'un atelier de l'OCDE sur la sélection des sols et des sédiments, qui s'est tenu à Belgirate, Italie, en 1995 (5), le nombre et le type de sols à utiliser dans le cadre de cet essai ont été définis. Les recommandations relatives au prélèvement, à la manipulation et au stockage des échantillons de sol s'appuient sur des lignes directrices de l'ISO (6) et sur les recommandations de l'atelier de Belgirate.

Pour déterminer et évaluer les caractéristiques toxiques des substances d'essai, il peut être nécessaire de déterminer leurs effets sur l'activité microbienne du sol, par exemple lorsqu'il est nécessaire de disposer de données sur les effets secondaires potentiels des produits phytosanitaires sur la microflore du sol ou bien en cas de risque d'exposition des micro-organismes du sol à des substances chimiques autres que les produits phytosanitaires. L'essai de transformation du carbone est effectué pour déterminer les effets de ces substances chimiques sur la microflore du sol. Si l'essai porte sur des produits agrochimiques (produits phytosanitaires, engrais, produits chimiques sylvicoles), deux essais sont effectués: l'essai de transformation du carbone et l'essai de transformation de l'azote. S'il s'agit d'autres substances que les produits agrochimiques, l'essai de transformation de l'azote suffit. Toutefois, si les valeurs CE_{50} de l'essai de transformation de l'azote relatives à ces substances chimiques correspondent à celles des inhibiteurs de la nitrification (nitrapyrine) commerciaux, un essai de transformation du carbone peut être effectué afin d'obtenir des informations complémentaires.

Les sols sont formés de composés vivants et non vivants qui existent sous forme de mélanges complexes et hétérogènes. Les micro-organismes jouent un rôle important dans la décomposition et la transformation de la matière organique en sol fertile et un grand nombre d'espèces contribuent aux différents aspects de la fertilisation des sols. Toute interférence à long terme avec ces processus biochimiques risque de perturber le cycle des éléments nutritifs et par conséquent d'altérer la fertilité du sol. La transformation du carbone et de l'azote se produit dans tous les sols fertiles. Bien que les colonies microbiennes responsables de ces processus diffèrent d'un sol à un autre, les voies de transformation sont identiques pour l'essentiel.

▼B

La méthode d'essai décrite ici est conçue pour détecter les effets nocifs à long terme d'une substance sur le processus de transformation du carbone à la surface aérobie des sols. L'essai est sensible aux changements de taille et d'activité des colonies microbiennes responsables de la transformation du carbone puisqu'il soumet ces colonies à la fois au stress chimique et à la carence en carbone. Un sol sableux pauvre en matière organique est utilisé. Ce sol est traité avec la substance d'essai et il est incubé dans des conditions permettant un métabolisme microbien rapide. Dans ces conditions, les sources de carbone présentes dans le sol sont rapidement épuisées. Cela provoque la carence en carbone qui tue à la fois les cellules microbiennes et qui induit la dormance et/ou la sporulation. Si la durée de l'essai est supérieure à 28 jours, on peut mesurer la somme de ces réactions dans les témoins (sol non traité) en mesurant la perte progressive de biomasse microbienne active métaboliquement (7). Si la biomasse d'un sol carence en carbone, dans les conditions de l'essai, est affectée par la présence d'une substance chimique, celle-ci peut ne pas retrouver le même niveau que l'échantillon témoin. C'est pourquoi la perturbation provoquée par la substance d'essai à n'importe quel moment de l'essai perdurera souvent jusqu'à la fin de l'essai.

Les essais à partir desquels la présente méthode d'essai a été mise au point étaient conçus principalement pour des substances dont il est possible d'estimer la quantité qui pénètre dans le sol. C'est le cas par exemple des produits phytosanitaires dont la dose d'application dans le champ est connue. Pour les produits agrochimiques, il suffit de pratiquer un essai sur deux doses correspondant au taux d'application prévu ou estimé. Les produits agrochimiques peuvent être testés sous forme de principes actifs (p.a.) ou de produits formulés. Toutefois, l'essai n'est pas limité aux substances chimiques dont les concentrations dans l'environnement peuvent être estimées. En modifiant à la fois la quantité de substance d'essai appliquée au sol, et le mode d'évaluation des données, on peut également utiliser l'essai pour les substances chimiques dont on ne connaît pas la quantité susceptible d'atteindre le sol. C'est pourquoi, dans le cas des produits non agrochimiques, les effets d'une série de concentrations sur la transformation du carbone sont déterminés. Les résultats de ces essais sont utilisés pour préparer une courbe dose-réponse et calculer les valeurs CE_X, où x est défini comme le pourcentage d'effet.

1.2. DÉFINITIONS

Transformation du carbone: dégradation par des micro-organismes de la matière organique en son produit final, le dioxyde de carbone inorganique.

CE_X (concentration produisant x % d'effet): concentration de la substance d'essai dans le sol qui produit x % d'inhibition de la transformation du carbone en dioxyde de carbone.

CE_{50} (concentration produisant 50 % d'effet): concentration de la substance d'essai dans le sol qui produit 50 % d'inhibition de la transformation du carbone en dioxyde de carbone.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Aucune.

▼B

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le sol tamisé est traité avec la substance d'essai ou laissé non traité (témoin). Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, il est recommandé d'utiliser au moins deux concentrations d'essai et celles-ci doivent être choisies en fonction de la concentration maximale prévisible dans le champ. Au bout de 0, 7, 14 et 28 jours d'incubation, les échantillons de sol traité et les échantillons témoins sont mélangés avec du glucose, et les taux de respiration induits par le glucose sont mesurés pendant 12 heures consécutives. Les taux de respiration sont exprimés en dioxyde de carbone dégagé (mg dioxyde de carbone/kg sol sec/h) ou oxygène consommé (mg oxygène/kg sol/h). On compare le taux moyen de respiration dans les échantillons de sol traité avec celui des échantillons témoins et on calcule l'écart en pourcentage entre l'échantillon traité et l'échantillon témoin. Tous les essais ont une durée de 28 jours au moins. Si, au 28^{e} jour, les différences entre les sols traités et les sols non traités sont égales ou supérieures à 25 %, les mesures se poursuivent à intervalles de 14 jours pendant une durée maximale de 100 jours. Si l'essai porte sur des substances chimiques autres que les produits agrochimiques, une série de concentrations de la substance d'essai est ajoutée aux échantillons de sol, et les taux de respiration induits par le glucose (moyenne des quantités de dioxyde de carbone formé ou l'oxygène consommé) sont mesurés au bout de 28 jours. Les résultats des essais effectués avec une série de concentrations sont analysés à l'aide d'un modèle de régression, et les valeurs CE_x sont calculées (CE_{50}, CE_{25} et/ou CE_{10}). Voir définitions.

1.5. VALIDITÉ DE L'ESSAI

L'évaluation des résultats des essais effectués avec des produits agrochimiques repose sur des différences relativement faibles (valeur moyenne ± 25 %) entre le dioxyde de carbone dégagé ou l'oxygène consommé dans (ou par) les échantillons témoins et les échantillons de sol traité, de sorte qu'une variabilité importante des témoins peut entraîner des résultats erronés. C'est pourquoi la variation entre les témoins doit être inférieure à ± 15 %.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Appareillage**

Des récipients d'essai en matériau chimiquement inerte sont utilisés. Ces récipients doivent avoir une contenance adaptée à la méthode d'incubation utilisée, c'est-à-dire incubation en vrac ou avec une série d'échantillons individuels (voir le point 1.7.1.2). Il convient de veiller à la fois à minimiser l'évaporation et à permettre l'échange gazeux pendant l'essai (les récipients d'essai peuvent par exemple être couverts d'une feuille de polyéthylène perforée). Lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, il convient d'utiliser des récipients hermétiques et étanches. La taille de ces récipients doit être telle qu'ils soient remplis environ au quart de leur contenance avec l'échantillon de sol.

Pour déterminer la respiration induite par le glucose, des systèmes d'incubation et des instruments de mesure de la production de dioxyde de carbone ou de la consommation d'oxygène sont nécessaires. On trouve des exemples de ces systèmes et de ces instruments dans la littérature (8) (9) (10) (11).

1.6.2. **Sélection et nombre de sols**

Un seul sol est utilisé. Les caractéristiques recommandées sont les suivantes:

— teneur en sable: supérieure à 50 % et inférieure à 75 %,

▼B

— pH: 5,5-7,5,

— teneur en carbone organique: 0,5-1,5 %,

— la biomasse microbienne doit être mesurée (12) (13) et sa teneur en carbone doit être égale à 1 % au moins du carbone organique total du sol.

Dans la plupart des cas, un sol possédant ces caractéristiques correspond aux conditions les plus défavorables, puisque l'adsorption de la substance chimique de l'essai est minimale et que l'exposition de la microflore est maximale. Il est donc généralement inutile d'effectuer des essais avec d'autres sols. Toutefois, dans certains cas, par exemple lorsque l'utilisation principale prévue de la substance d'essai concerne des sols particuliers comme les sols forestiers acides, ou dans le cas de substances chimiques chargées électrostatiquement, il peut être nécessaire d'utiliser un sol différent.

1.6.3. **Prélèvement et stockage des échantillons de sol**

1.6.3.1. *Prélèvement*

Il est nécessaire de fournir des informations détaillées sur l'historique du site de prélèvement. Ces détails doivent comprendre la localisation exacte, le couvert végétal, les dates de traitement avec des produits phytosanitaires, les traitements aux engrais organiques et inorganiques, les apports biologiques ou les contaminations accidentelles. Le site choisi pour le prélèvement de sol doit être de nature à permettre une utilisation de longue durée. Les pâturages permanents, les champs plantés de céréales annuelles (à l'exception du maïs) ou à ensemencement dense en engrais verts conviennent. Le site de prélèvement retenu ne doit pas avoir été traité avec des produits phytosanitaires pendant un an au moins avant les prélèvements. De même, aucun engrais organique ne doit avoir été appliqué pendant au moins six mois. L'utilisation d'engrais minéraux est acceptable uniquement si elle satisfait aux exigences de la culture, et les échantillons de sol ne doivent être prélevés qu'au moins trois mois après l'application d'engrais. L'utilisation de sol traité avec des engrais aux effets biologiques connus (cyanamide calcique) doit être évitée.

Il convient d'éviter de prélever des échantillons pendant ou immédiatement après de longues périodes (plus de 30 jours) de sécheresse ou de saturation en eau. En ce qui concerne les sols labourés, les échantillons doivent être prélevés à une profondeur de 0 à 20 cm. En ce qui concerne les herbages (pâture) ou les sols qui ne sont pas labourés pendant de longues périodes (au moins une période végétative), la profondeur maximale du prélèvement peut être légèrement supérieure à 20 cm (25 cm par exemple). Les échantillons de sol doivent être transportés dans des récipients et dans des conditions de température de nature à garantir que les propriétés initiales du sol ne soient pas altérées de manière significative.

1.6.3.2. *Stockage*

Il est préférable d'utiliser des sols qui viennent d'être extraits du site. S'il n'est pas possible d'éviter le stockage dans le laboratoire, les sols peuvent être entreposés dans le noir à 4 ± 2 °C pendant une durée maximale de trois mois. Pendant la durée de stockage des sols, des conditions aérobies doivent être assurées. Si les sols sont prélevés dans une zone où il gèle au moins trois mois par an, il peut être envisagé de stocker le sol pendant six mois à — 18 °C. La biomasse microbienne des sols stockés est mesurée avant chaque expérience et le carbone présent dans la biomasse doit être égal à 1 % au moins de la teneur totale en carbone organique du sol (voir le point 1.6.2).

▼B

1.6.4. **Manipulation et traitement du sol pour l'essai**

1.6.4.1. *Préincubation*

Si le sol a été stocké (voir les points 1.6.4.2 et 1.7.1.3), il est recommandé de procéder à une préincubation pendant 2 à 28 jours. La température et la teneur en eau du sol pendant la préincubation doivent être les mêmes que celles utilisées pendant l'essai (voir les points 1.6.4.2 et 1.7.1.3).

1.6.4.2. *Propriétés physico-chimiques*

Le sol est débarrassé manuellement des gros objets (pierres, débris végétaux, etc.) puis tamisé humide sans séchage excessif jusqu'à obtention d'une granulométrie inférieure ou égale à 2 mm. La teneur en eau de l'échantillon doit être ajustée avec de l'eau distillée ou désionisée à une valeur située entre 40 % et 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau.

1.6.5. **Préparation de la substance d'essai à appliquer au sol**

La substance d'essai est généralement appliquée à l'aide d'un excipient. L'excipient peut être de l'eau (pour les substances solubles dans l'eau) ou un solide inerte comme du sable de quartz fin (granulométrie: 0,1-0,5 mm). Il convient d'éviter les excipients liquides autres que l'eau (solvants organiques tels que l'acétone ou le chloroforme), car ils peuvent endommager la microflore. Si l'on utilise du sable comme excipient, celui-ci peut être traité par la substance d'essai dissoute ou en suspension dans un solvant approprié. Dans ce cas, le solvant doit être éliminé par évaporation avant de mélanger l'excipient avec le sol. Pour obtenir une répartition optimale de la substance d'essai dans le sol, un rapport de 10 g de sable par kilogramme de sol (poids sec) est recommandé. Les échantillons témoins sont traités avec une quantité équivalente d'eau et/ou de sable de quartz uniquement.

Lorsque l'on teste des substances chimiques volatiles, il convient d'éviter dans la mesure du possible les pertes pendant le traitement et il convient d'essayer de veiller à la répartition homogène dans l'échantillon de sol (la substance d'essai doit être injectée dans le sol en plusieurs endroits).

1.6.6. **Concentrations d'essai**

Si l'essai porte sur des produits phytosanitaires ou sur d'autres substances chimiques dont les concentrations dans l'environnement peuvent être estimées, il convient d'utiliser au moins deux concentrations. La concentration la plus faible doit correspondre au moins à la quantité maximale susceptible de pénétrer dans le sol dans des conditions réelles alors que la concentration la plus élevée doit être un multiple de la concentration la plus faible. Les concentrations de substance d'essai ajoutées au sol sont calculées en supposant une incorporation uniforme à une profondeur de 5 cm et une densité apparente du sol de 1,5. Dans le cas des produits agrochimiques appliqués directement sur le sol, ou des substances chimiques dont on peut prévoir la quantité qui pénètre dans le sol, les concentrations d'essai recommandées sont égales à la concentration maximale prévisible dans l'environnement (CPE) et cinq fois cette concentration. Les substances qui doivent être appliquées sur le sol plusieurs fois au cours d'une même saison doivent être testées à des concentrations calculées en multipliant la CPE par le nombre maximal d'applications prévues. La concentration la plus élevée testée ne doit toutefois pas dépasser dix fois la dose maximale d'application unique.

Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, une série géométrique de cinq concentrations au moins est utilisée. Les concentrations testées doivent couvrir la gamme nécessaire pour déterminer les valeurs CE_x.

▼B

1.7. EXÉCUTION DE L'ESSAI

1.7.1. **Conditions expérimentales**

1.7.1.1. *Traitement et contrôle*

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, le sol est divisé en trois fractions de poids égal. Deux fractions sont mélangées avec l'excipient contenant le produit, et la troisième avec l'excipient sans produit (témoin). Il est recommandé de préparer un minimum de trois réplicats de sol traité et non traité. Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, le sol est divisé en six fractions de poids égal. Cinq échantillons sont mélangés avec l'excipient contenant la substance d'essai, et le sixième est mélangé avec l'excipient sans la substance chimique. Il est recommandé de préparer trois réplicats de sol traité et de témoins. Il convient de veiller à la répartition homogène de la substance d'essai dans les échantillons de sol traité. Pendant le mélange, il convient d'éviter la compression ou le compactage du sol.

1.7.1.2 *Incubation des échantillons de sol*

L'incubation des échantillons de sol peut être effectuée de deux façons: sous forme d'échantillons en vrac de sol traité et de sol non traité ou sous forme d'une série de sous-échantillons individuels et de taille identique de chaque sol traité et non traité. Toutefois, lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, l'essai doit être effectué uniquement avec une série de sous-échantillons individuels. Lorsque les sols sont incubés en vrac, de grandes quantités de chaque sol traité et non traité sont préparées et les sous-échantillons à analyser sont prélevés en fonction des besoins pendant l'essai. La quantité préparée initialement pour chaque traitement et pour le contrôle dépend de la taille des sous-échantillons, du nombre de réplicats utilisés pour l'analyse et du nombre maximal de temps de prélèvement. Les sols incubés en vrac doivent être soigneusement mélangés avant de procéder au sous-échantillonnage. Lorsque les sols sont incubés sous forme d'échantillons individuels, on divise chaque sol en vrac traité et non traité dans le nombre requis de sous-échantillons, et ceux-ci sont utilisés selon les besoins. Dans les expériences où l'on peut prévoir plus de deux temps de prélèvement, une quantité suffisante de sous-échantillons doit être préparée pour tenir compte de tous les réplicats et de tous les temps de prélèvement. Au moins trois exemplaires de sol d'essai doivent être incubés en milieu aérobie (voir le point 1.7.1.1). Pendant tous les essais, il convient d'utiliser des récipients appropriés comportant un espace libre suffisant afin d'éviter le développement de conditions anaérobies. Lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, il doit être effectué uniquement avec une série de sous-échantillons individuels.

1.7.1.3. *Conditions et durée de l'essai*

L'essai est effectué dans le noir à température ambiante de 20 ± 2 °C. Pendant l'essai, la teneur en eau des échantillons de sol doit être maintenue entre 40 % et 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau du sol (voir le point 1.6.4.2) avec une marge de ± 5 %. De l'eau distillée, désionisée peut être ajoutée si nécessaire.

La durée minimale de l'essai est de 28 jours. Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, on compare les quantités de dioxyde de carbone dégagé ou d'oxygène consommé dans les échantillons traités et dans les échantillons témoins. Si celles-ci diffèrent de plus de 25 % au jour 28, on poursuit l'essai jusqu'à obtenir une différence égale ou inférieure à 25 %, ou pendant une durée maximale de 100 jours, si celle-ci est la plus courte. Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, l'essai est arrêté au bout de 28 jours. Au jour 28, les quantités de dioxyde de carbone dégagé ou d'oxygène consommé dans les échantillons traités et les échantillons témoins sont déterminées et les valeurs CE_x sont calculées.

▼B

1.7.2. **Prélèvement et analyse des sols**

1.7.2.1. *Échelonnement des prélèvements*

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, les échantillons de sol font l'objet d'une analyse de mesure des taux de respiration induits par le glucose aux jours 0, 7, 14 et 28. S'il est nécessaire de prolonger l'essai, de nouvelles mesures doivent être effectuées tous les 14 jours après le jour 28.

Lorsque l'essai porte sur des produits non agrochimiques, au moins cinq concentrations d'essai sont utilisées et les échantillons de sol sont analysés pour mesurer la respiration induite par le glucose au début (jour 0) et à la fin de la période d'exposition (28 jours). Une mesure intermédiaire, par exemple au jour 7, peut être ajoutée si nécessaire. Les données obtenues au jour 28 sont utilisées pour déterminer la valeur CE_x de la substance chimique. Si on le souhaite, on peut utiliser les données des témoins du jour 0 afin d'estimer les quantités initiales de biomasse microbienne métaboliquement active dans le sol (12).

1.7.2.2. *Mesure des taux de respiration induits par le glucose*

Le taux de respiration induit par le glucose est déterminé dans chaque échantillon de sol traité et dans chaque témoin à chaque temps de prélèvement. Les échantillons de sol sont mélangés avec une quantité de glucose suffisante pour entraîner une réaction respiratoire maximale immédiate. La quantité de glucose nécessaire pour provoquer une réaction respiratoire maximale dans un sol donné peut être déterminée dans un essai préliminaire à l'aide d'une série de concentrations de glucose (14). Toutefois, dans le cas des sols sableux contenant 0,5-1,5 % de carbone organique, 2 000 mg à 4 000 mg de glucose par kg de poids sec sont généralement suffisants. Le glucose peut être réduit en poudre avec du sable de quartz propre (10 g sable/kg poids sec) et mélangé de façon homogène avec le sol.

Les échantillons de sol amendés avec le glucose sont incubés dans un appareil adapté pour mesurer les taux de respiration en continu, toutes les heures, ou toutes les deux heures (voir point 1.6.1) à 20 ± 2 °C. Le dioxyde de carbone dégagé ou l'oxygène consommé est mesuré pendant 12 heures consécutives et les mesures doivent commencer le plus rapidement possible, c'est-à-dire 1 à 2 heures après l'adjonction de glucose. On mesure la quantité totale de dioxyde de carbone dégagé ou d'oxygène consommé pendant les 12 heures et on détermine le taux moyen de respiration.

2 **DONNÉES**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, le dioxyde de carbone dégagé ou l'oxygène consommé par chaque réplicat doit être enregistré, et les valeurs moyennes de tous les réplicats doivent être présentées sous forme de tableau. Les résultats doivent être évalués à l'aide de méthodes statistiques appropriées et généralement reconnues (F-test, seuil de signification de 5 %). Les taux de respiration induits par le glucose sont exprimés en mg de dioxyde de carbone/kg poids sec/h ou mg oxygène/poids sec/h. Le taux moyen de formation de dioxyde de carbone ou le taux moyen de consommation d'oxygène de chaque échantillon traité est comparé à celui du témoin, et l'écart en pourcentage par rapport au témoin est calculé.

▼B

Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, les quantités de dioxyde de carbone dégagé ou d'oxygène consommé dans chaque réplicat sont déterminées, et une courbe dose-réponse est établie pour déterminer les valeurs CE_x. Les taux de respiration induits par le glucose (mg de dioxyde de carbone/kg poids sec/h ou mg oxygène/poids sec/h) observés dans les échantillons traités au bout de 28 jours sont comparés à ceux des échantillons témoins. À partir de ces résultats, on calcule le pourcentage des valeurs d'inhibition pour chaque concentration d'essai. Une courbe de pourcentages en fonction de la concentration est établie, et on utilise ensuite une méthode statistique pour calculer les valeurs CE_x. Les seuils de confiance ($p = 0,95$) des CE_x calculées sont également déterminés à l'aide des méthodes standard (15) (16) (17).

2.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Lorsqu'on évalue les résultats d'essais avec des produits agrochimiques, et que la différence de taux de respiration entre l'échantillon le moins traité (concentration maximale prévisible) et l'échantillon témoin est égale ou inférieure à 25 % quel que soit le temps de prélèvement après le jour 28, le produit peut être considéré comme n'ayant aucune influence à long terme sur la transformation du carbone dans le sol. Lorsqu'on évalue les résultats d'essais avec des substances chimiques autres que les produits agrochimiques, on utilise les valeurs CE_{50}, CE_{25} et/ou CE_{10}.

3. **RAPPORT D'ESSAI**

RAPPORT DE L'ESSAI

Le rapport de l'essai doit comporter les informations suivantes:

Identification complète du sol utilisé, à savoir:

— coordonnées géographiques du site (latitude, longitude),

— information sur l'historique du site (couvert végétal, traitement aux produits phytosanitaires, traitement aux engrais, contamination accidentelle, etc.),

— type d'utilisation (sol agricole, forestier, etc.),

— profondeur du prélèvement (cm),

— teneur en sable/limon/argile (% poids sec),

— pH (dans l'eau),

— teneur en carbone organique (% poids sec),

— teneur en azote (% poids sec),

— capacité d'échange cationique (mmol/kg),

— biomasse microbienne initiale en pourcentage du carbone organique total,

— référence des méthodes utilisées pour la détermination de chaque paramètre,

— toutes les informations relatives au prélèvement et au stockage des échantillons de sol,

— détails de la préincubation du sol s'il y a lieu.

▼B

Substance d'essai:

— nature physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques,

— données d'identification des substances chimiques, s'il y a lieu, notamment la formule structurale, la pureté (pour les produits phytosanitaires, le pourcentage de produit actif), la teneur en azote.

Conditions de l'essai:

— détails de la modification du sol avec un substrat organique,

— nombre de concentrations de la substance d'essai utilisée et, le cas échéant, justification des concentrations sélectionnées,

— procédure d'application de la substance d'essai au sol,

— température d'incubation,

— teneur en eau du sol au début et pendant le déroulement de l'essai,

— méthode d'incubation du sol utilisée (en vrac ou en série de sous-échantillons individuels),

— nombre de réplicats,

— temps de prélèvement.

Résultats:

— méthode et matériel utilisés pour mesurer les taux de respiration,

— tableaux indiquant les valeurs individuelles et les valeurs moyennes des quantités de dioxyde de carbone ou d'oxygène,

— variation entre réplicats dans les échantillons traités et dans les échantillons témoins,

— explications des corrections apportées aux calculs, s'il y a lieu,

— la variation en pourcentage des taux de respiration induits par le glucose à chaque temps de prélèvement ou, le cas échéant, la valeur CE_{50} avec une limite de confiance de 95 %, les autres valeurs CE_X (CE_{25} ou CE_{10}) avec des intervalles de confiance, et un graphique de la courbe dose-réponse,

— traitement statistique des résultats, s'il y a lieu,

— toutes informations et observations utiles pour l'interprétation des résultats.

4. **RÉFÉRENCES**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24, p. 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼B

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in «Pesticide Effects on Soil Microflora». Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3, p. 45-60.

(8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in «Methods of Soil Analysis — Part 2: Chemical and Microbiological Properties». Agronomy Monograph N° 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41, p. 831-871.

(9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality — Guidance on Laboratory Tests, for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

(10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(11) Heinemeyej, O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116, p. 77-81.

(12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(14) Malkomes, H.-P. (1986). EinfluB von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenuber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38, p. 113-120.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol, and Exper. Ther., 96, p. 99-113.

(16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.23. TRANSFORMATION AÉROBIE ET ANAÉROBIE DANS LE SOL

1. MÉTHODE

La présente méthode d'essai reprend la méthode TG 307 (2002) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode d'essai s'appuie sur les lignes directrices existantes (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). La méthode décrite ici est conçue pour mesurer la transformation aérobie et anaérobie des substances chimiques dans le sol. Les expériences ont pour but de déterminer i) le taux de transformation de la substance d'essai, et ii) la nature des produits de transformation auxquels les végétaux et les organismes du sol peuvent être exposés, ainsi que les taux de formation et de déplétion de ces produits. Ces études sont nécessaires pour les substances chimiques qui sont appliquées directement sur le sol ou qui sont susceptibles d'atteindre l'environnement du sol. Les résultats de ces études de laboratoire peuvent également être utilisés pour mettre au point des protocoles d'échantillonnage et d'analyse destinés à des études dans des domaines voisins.

Il est généralement suffisant d'effectuer des études aérobies et anaérobies avec un seul type de sol pour déterminer les voies de transformation (8) (10) (11). Les taux de transformation doivent être déterminés dans trois autres sols au moins (8) (10).

Un atelier de l'OCDE sur la sélection des sols et des sédiments, organisé à Belgirate, en Italie, en 1995 (10), a défini notamment le nombre et le type de sols à utiliser dans le cadre de cet essai. Les types de sol testés doivent être représentatifs des conditions environnementales d'utilisation ou de rejet prévus. Par exemple, les substances chimiques devant être appliquées sous des climats subtropicaux ou tropicaux doivent être testées avec des Ferrasols ou des Nitosols (système FAO). Cet atelier a également formulé des recommandations relatives au prélèvement, à la manipulation et au stockage des échantillons de sol, sur la base des lignes directrices de l'ISO (15). L'utilisation de sols de rizières est également étudiée dans le cadre de cette méthode.

1.2. DÉFINITIONS

Substance d'essai: toute substance, qu'il s'agisse de la substance mère ou des produits de transformation correspondants.

Produits de transformation: toute substance résultant de réactions de transformations biotiques ou abiotiques de la substance d'essai et en particulier le CO_2 et les produits qui se trouvent dans les résidus liés.

Résidus liés: les «résidus liés» désignent des composés du sol, végétaux ou animaux, qui subsistent dans la matrice après extraction, sous forme de la substance mère ou de ses métabolite(s)/produits de transformation. La méthode d'extraction ne doit pas modifier de manière substantielle les composés eux-mêmes ni la structure de la matrice. La nature de la liaison peut être clarifiée en partie par des méthodes d'extraction qui modifient la matrice et par des techniques analytiques complexes. C'est de cette façon que l'on a déterminé jusqu'ici la nature de la liaison, covalente, ionique et de la liaison par sorption ou piégeage. De manière générale, la formation de résidus liés abaisse sensiblement la bioaccessibilité et la biodisponibilité (12) [modifié d'après l'UICPA 1984 (13)].

Transformation aérobie: réaction se produisant en présence d'oxygène moléculaire (14).

▼B

Transformation anaérobie: réaction se produisant en l'absence d'oxygène moléculaire (14).

Sol: mélange de constituants chimiques minéraux et organiques, ces derniers contenant des composés à haute teneur en carbone et en azote, et à poids moléculaire élevé, contenant de petits (principalement micro) organismes. Le sol peut être manipulé sous deux formes:

a) non brassé, tel qu'il s'est formé au cours du temps, en couches caractéristiques d'un grand nombre de types de sol;

b) brassé, tel qu'on le trouve habituellement dans les terres arables ou qu'il est recueilli en creusant et tel qu'il est utilisé dans la présente méthode d'essai (14).

Minéralisation: dégradation complète d'un composé organique en CO_2 et H_2O dans des conditions aérobies, et en CH_4, CO_2 et H_2O dans des conditions anaérobies. Dans le cadre de la présente méthode d'essai, lorsqu'on utilise un composé marqué au ^{14}C, la minéralisation désigne la dégradation importante au cours de laquelle un atome de carbone marqué est oxydé quantitativement avec dégagement de la quantité correspondante de $^{14}CO_2$ (14).

Demi-vie: $t_{0,5}$, temps nécessaire à la transformation de 50 % d'une substance d'essai lorsque la transformation peut être décrite par une cinétique du premier ordre; la demi-vie est indépendante de la concentration.

DT_{50} (temps de dégradation 50): période au cours de laquelle la concentration de la substance d'essai diminue de 50 %; elle est différente de la demi-vie $t_{0,5}$ lorsque la transformation ne suit pas une cinétique du premier ordre.

DT_{75} (temps de dégradation 75): période au cours de laquelle la concentration de la substance d'essai diminue de 75 %.

DT_{90} (temps de dégradation 90): période au cours de laquelle la concentration de la substance d'essai diminue de 90 %.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Des substances de référence doivent être utilisées pour caractériser et/ou identifier les produits de transformation par des méthodes spectroscopiques et chromatographiques.

1.4. APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

La méthode s'applique à toutes les substances chimiques (non marquées ou radiomarquées) pour lesquelles il existe une méthode analytique présentant une précision et une sensibilité suffisantes. Elle peut être appliquée aux composés légèrement volatils, non volatils, solubles ou insolubles dans l'eau. L'essai ne doit pas être appliqué aux substances chimiques fortement volatiles à partir du sol (fumigants, solvants organiques) et qui ne peuvent donc pas être maintenues dans le sol dans les conditions expérimentales de cet essai.

▼B

1.5. INFORMATIONS RELATIVES À LA SUBSTANCE D'ESSAI

Une substance d'essai marquée ou non marquée peut être utilisée pour mesurer le taux de transformation. Il est nécessaire d'utiliser du matériel marqué pour étudier les voies de transformation et établir un bilan massique. Le marquage au ^{14}C est recommandé mais l'utilisation d'autres isotopes, comme ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P, peut aussi être utile. Dans la mesure du possible, le marquage doit être situé dans la(les) partie(s) la(les) plus stable(s) de la molécule ([1]). La pureté de la substance d'essai doit être d'au moins 95 %.

Avant de procéder à un essai sur la transformation aérobie et anaérobie dans le sol, il convient de disposer des informations suivantes sur la substance d'essai:

a) solubilité dans l'eau (Méthode A.6)

b) solubilité dans les solvants organiques;

c) pression de vapeur (Méthode A.4) et constante de la loi de Henry;

d) coefficient de partage n-octanol/eau (Méthode A.8);

e) stabilité chimique dans le noir (hydrolyse) (Méthode C.7);

f) coefficient pK_a si une molécule est susceptible de subir une protonation ou une déprotonation (ligne directrice 112 de l'OCDE) (16).

Il peut également être utile de disposer d'informations relatives à la toxicité de la substance d'essai sur les micro-organismes du sol (Méthodes d'essai C.21 et C.22) (16).

Il faut disposer des méthodes analytiques (dont des méthodes d'extraction et de purification) nécessaires à la quantification et à l'identification de la substance d'essai et de ses produits de transformation.

1.6. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Les échantillons de sol sont traités avec la substance d'essai et incubés dans le noir dans des flacons de type biomètre ou dans des systèmes à circulation continue dans des conditions de laboratoire contrôlées (à température et humidité constantes). Après un intervalle de temps approprié, les échantillons de sol sont extraits et analysés pour mesurer la substance mère et les produits de transformation. Les produits volatils sont aussi collectés pour analyse au moyen de dispositifs d'absorption appropriés. À l'aide de produit marqué au ^{14}C, il est possible de mesurer les différents taux de minéralisation de la substance d'essai en piégeant le $^{4}CO_2$ dégagé, et un bilan massique, notamment la formation de résidus liés au sol, peut être établi.

1.7. CRITÈRES DE QUALITÉ

1.7.1. **Récupération**

L'extraction et l'analyse, en double exemplaire au moins, des échantillons de sol immédiatement après l'addition de la substance d'essai donnent une première indication de la reproductibilité de la méthode analytique et de l'uniformité de la procédure d'application de la substance d'essai. Les taux de récupération concernant les étapes ultérieures des expériences sont fournis par les bilans massiques respectifs. Ces taux de récupération doivent osciller entre 90 % et 110 % pour les substances chimiques marquées (8) et entre 70 % et 110 % pour les substances chimiques non marquées (3).

([1]) Par exemple, si la substance d'essai contient un cycle, il est nécessaire de marquer ce cycle; si la substance d'essai contient deux cycles ou plus, il peut être nécessaire d'effectuer des études distinctes pour évaluer le devenir de chaque cycle marqué et obtenir des informations fiables sur la formation de produits de transformation.

▼B

1.7.2. **Reproductibilité et sensibilité de la méthode analytique**

La reproductibilité de la méthode analytique (à l'exception du rendement d'extraction initial) servant à quantifier la substance d'essai et les produits de transformation peut être contrôlée en effectuant en double les analyses du même extrait de sol, incubé suffisamment longtemps pour permettre la formation de produits de transformation.

Le seuil de détection de la méthode d'analyse de la substance d'essai et des produits de transformation doit être au moins égal à 0,01 $mg.kg-^{1}$ de sol (substance d'essai) ou 1 % de la dose appliquée si celle-ci est inférieure. Le seuil de quantification doit également être spécifié.

1.7.3. **Précision des données de transformation**

L'analyse de régression des concentrations de la substance d'essai en fonction du temps permet d'obtenir les informations sur la précision de la courbe de transformation et de calculer les limites de confiance des demi-vies (en cas de cinétique du pseudo premier ordre) ou des valeurs DT_{50} et, le cas échéant, des valeurs DT_{75} et DT_{90}.

1.8. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.8.1. **Appareils et réactifs chimiques**

Les incubateurs sont composés de circuits fermés statiques ou de systèmes à circulation continue adaptés (7) (17). Les figures 1 et 2, respectivement, présentent des exemples d'incubateur à circulation continue et de flacons de type biomètre. Les deux types d'incubateur présentent des avantages et des inconvénients (7) (17).

Matériel courant de laboratoire, notamment:

— instruments d'analyse: chromatographie gaz-liquide, chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), chromatographie en couche mince, y compris les systèmes de détection appropriés pour analyser les substances radiomarquées ou non marquées ou la méthode de dilution isotopique inverse,

— instruments destinés à l'identification (spectromètre de masse, chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS, HPLC-MS, RMN, etc.),

— compteur à scintillation liquide,

— appareillage d'oxydation pour la combustion des produits radioactifs,

— centrifugeuse,

— appareil d'extraction (par exemple, tubes de centrifugation pour extraction à froid et appareil pour extraction en continu sous reflux de type soxhlet),

— instrumentation pour concentrer les solutions et les extraits (évaporateur rotatif),

— bain-marie,

— mélangeurs mécaniques (pétrin, mélangeur rotatif).

▼B

Les réactifs chimiques utilisés sont, par exemple:

— NaOH, de pureté analytique, 2 mol . dm^{-3}, ou une autre base appropriée (par exemple, KOH, éthanolamine),

— H_2SO_4, de pureté analytique, 0,05 mol . dm^{-3},

— Éthylène glycol, de pureté analytique,

— matériaux d'absorption solide tels que chaux sodée et tampons de polyuréthane,

— solvants organiques, de pureté analytique, tels qu'acétone, méthanol, etc.,

— liquide de scintillation.

1.8.2. **Application de la substance d'essai**

Pour l'incorporer et la répartir dans le sol, on peut dissoudre la substance d'essai dans l'eau (désionisée ou distillée) ou, si nécessaire, dans une quantité minimale d'acétone ou d'autres solvants organiques (6) dans lesquels la substance d'essai est suffisamment soluble et stable. Toutefois, la quantité de solvant sélectionnée ne doit pas avoir une influence significative sur l'activité microbienne du sol (voir les points 1.5 et 1.9.2-1.9.3). Il convient d'éviter d'utiliser des solvants qui inhibent l'activité microbienne, comme le chloroforme, le dichlorométhane et autres solvants halogénés.

La substance d'essai peut également être ajoutée sous forme solide, mélangée avec du sable de quartz (6) ou dans un petit sous-échantillon de sol séché à l'air et stérilisé. Si la substance d'essai est ajoutée à l'aide d'un solvant, le solvant doit pouvoir s'évaporer avant que le sous-échantillon chargé soit ajouté à l'échantillon original de sol non stérile.

Pour les substances chimiques courantes, dont la principale voie de pénétration dans le sol passe par les boues d'épuration ou le traitement agricole, il convient de commencer par ajouter la substance d'essai dans la boue avant de l'introduire dans l'échantillon de sol (voir les points 1.9.2 et 1.9.3).

Il n'est pas recommandé d'utiliser systématiquement des produits formulés. Toutefois, pour les substances peu solubles, l'utilisation de produit formulé peut être une solution appropriée.

1.8.3. **Sols**

1.8.3.1. *Sélection du sol*

Pour déterminer la voie de transformation, on peut utiliser un sol représentatif; un limon sableux, un limon fin, un limon ou un sable limoneux [selon la classification de la FAO et de l'USDA (18)] avec un pH de 5,5-8,0, une teneur en carbone organique de 0,5-2,5 % et une biomasse microbienne d'au moins 1 % de carbone organique total est recommandée (10).

Pour les études des taux de transformation, il convient d'utiliser au moins trois sols supplémentaires représentatifs de la gamme de sols concernés. La teneur en carbone organique, le pH, la teneur en argile et la biomasse microbienne des sols doivent varier (10).

▼B

Pour tous les sols, il convient d'établir au moins les caractéristiques suivantes: texture (% sable, % limon, % argile) [selon la classification de la FAO et de l'USDA (18)], pH, capacité d'échange cationique, carbone organique, densité apparente, caractéristiques de rétention d'eau ([1]) et biomasse microbienne (pour les études aérobies uniquement). Des informations complémentaires sur les propriétés du sol peuvent être utiles pour interpréter les résultats. Les méthodes recommandées dans les références (19) (20) (21) (22) (23) peuvent être utilisées pour déterminer les caractéristiques du sol. La biomasse microbienne doit être déterminée à l'aide de la méthode de respiration induite par le substrat (SIR) (25) (26) ou d'autres méthodes (20).

1.8.3.2. *Prélèvement, manipulation et stockage des sols*

Il est nécessaire de fournir des informations détaillées sur l'historique du site de prélèvement, qui englobent la localisation, le couvert végétal, les traitements aux substances chimiques, les traitements aux engrais organiques et inorganiques, les apports biologiques ou d'autres contaminations. Si les sols ont été traités avec la substance d'essai ou ses analogues structuraux au cours des quatre années précédentes, ils ne doivent pas être utilisés pour les études de transformation (10) (15).

Le sol doit être fraîchement extrait du site (de l'horizon A ou de la couche supérieure de 20 cm) avec une teneur en eau facilitant le tamisage. Pour les sols autres que les sols de rizières, il faut éviter de prélever les échantillons pendant ou immédiatement après de longues périodes (> 30 jours) de sécheresse, de gel ou d'inondations (14). Les échantillons doivent être transportés de façon à minimiser les modifications de la teneur en eau du sol et conservés dans le noir avec libre circulation d'air, dans la mesure du possible. Un sac en polyéthylène à fermeture non étanche est généralement indiqué à cet effet.

Le sol doit être traité le plus rapidement possible après le prélèvement. Il convient de retirer les gros débris végétaux, animaux et les pierres avant de passer le sol à travers un tamis de 2 mm pour retirer les petits débris de pierres, et les débris animaux et végétaux. Il convient d'éviter de sécher et de broyer le sol de manière importante avant de le tamiser (15).

Lorsqu'il est difficile de prélever des échantillons en hiver (sol gelé ou recouvert d'une couche de neige), ceux-ci peuvent être prélevés sur un lot de sol stocké dans une serre sous couvert végétal (herbe ou mélange d'herbe et de trèfle). Il est nettement préférable d'effectuer des études avec des sols qui viennent d'être extraits du site, mais si le sol prélevé et traité doit être stocké avant le début de l'étude, les conditions de stockage doivent être appropriées et leur durée doit être limitée (4 + 2 °C pendant une durée maximale de trois mois) afin de préserver l'activité microbienne ([2]). On trouvera des instructions détaillées sur le prélèvement, la manipulation et le stockage des sols à utiliser pour les expériences de biotransformation sous les références (8) (10) (15) (26) (27).

([1]) La caractéristique de rétention d'eau d'un sol peut être mesurée comme capacité au champ, capacité de rétention d'eau ou comme potentiel de succion (pF). Pour les explications, voir l'annexe 1. Il convient d'indiquer dans le rapport d'essai si les caractéristiques de rétention d'eau et la densité apparente des sols ont été déterminées sur des échantillons de sol non brassé ou avec des échantillons brassés (transformés).

([2]) Des résultats récents indiquent que les sols des zones tempérées peuvent également être stockés à — 20 °C pendant plus de trois mois (28) (29) sans perte significative de l'activité microbienne.

▼B

Avant son utilisation dans le cadre du présent essai, le sol traité doit être préincubé afin de permettre la germination et l'élimination des semences, et de rétablir l'équilibre du métabolisme microbien après le passage des conditions de prélèvement ou de stockage aux conditions d'incubation. Une période de préincubation de 2 à 28 jours approchant les conditions de température et d'humidité de l'essai réel est généralement indiquée (15). La durée du stockage et de la préincubation ne doit pas dépasser trois mois au total.

1.9. EXÉCUTION DE L'ESSAI

1.9.1. **Conditions de l'essai**

1.9.1.1. *Température de l'essai*

Au cours de toute la période d'essai, les sols doivent être incubés dans le noir, à température constante, respectant les conditions climatiques dans lesquelles l'utilisation ou le rejet interviendra. Une température de 20 ± 2 °C est recommandée pour toutes les substances d'essai susceptibles d'entrer en contact avec le sol dans les climats tempérés. La température doit être enregistrée.

Pour les substances chimiques appliquées ou libérées dans les climats froids (par exemple dans les pays nordiques, pendant l'automne/hiver), des échantillons de sol supplémentaires doivent également être incubés mais à une température plus basse (par exemple à 10 ± 2 °C).

1.9.1.2. *Teneur en humidité*

Pour les essais de transformation en milieu aérobie, la teneur en humidité du sol ([1]) doit être ajustée et maintenue à une pF située entre 2,0 et 2,5 (3). La teneur en humidité du sol est exprimée en masse d'eau par masse de sol sec et elle doit être contrôlée régulièrement (toutes les 2 semaines par exemple) en pesant les flacons d'incubation et les pertes en eau doivent être compensées par l'adjonction d'eau (de préférence de l'eau du robinet stérilisée par filtration). Il convient de veiller à éviter ou à réduire les pertes de substance d'essai et/ou des produits de transformation par évaporation et/ou photodégradation (le cas échéant) pendant l'ajout d'eau.

Pour les essais de transformation dans des conditions anaérobies et de rizière, le sol est saturé en eau par submersion.

1.9.1.3. *Conditions d'incubation aérobies*

Dans les systèmes à circulation continue, les conditions aérobies sont maintenues par lessivage périodique ou par aération continue avec de l'air humidifié. Dans les flacons de type biomètre, l'échange d'air est maintenu par diffusion.

1.9.1.4. *Conditions aérobies stériles*

Pour obtenir des informations sur l'importance de la transformation abiotique d'une substance d'essai, les échantillons de sol peuvent être stérilisés (pour les méthodes de stérilisation, voir les références 16 et 29), traités avec une substance d'essai stérile (par exemple l'addition de solution à travers un filtre stérile) et aérés avec de l'air stérile humidifié comme décrit au point 1.9.1.3. Pour les sols de rizière, le sol et l'eau doivent être stérilisés et l'incubation doit être effectuée comme décrit au point 1.9.1.6.

([1]) Le sol ne doit jamais être trop humide ni trop sec afin de maintenir des conditions adéquates d'aération et de nutrition de la microflore du sol. Les teneurs en eau recommandées pour une croissance microbienne optimale vont de 40 à 60 % de capacité de rétention d'eau (WHC) et de 0,1 à 0,33 bar (6). Cette fourchette est équivalente à un intervalle de pF de 2,0-2,5. L'annexe 2 présente la teneur habituelle en eau de plusieurs types de sol.

▼B

1.9.1.5. *Conditions d'incubation anaérobies*

Afin de créer et de maintenir des conditions anaérobies, le sol traité avec la substance d'essai et incubé dans des conditions aérobies pendant 30 jours ou une demi-vie ou DT_{50} (si celle-ci est plus courte) est ensuite recouvert d'eau (couche de 1-3 cm d'eau) et le système d'incubation est balayé avec un gaz inerte (azote ou argon) ([1]). Le système d'essai doit permettre de mesurer le pH, la concentration en oxygène et le potentiel redox et comprendre des dispositifs de piégeage des produits volatiles. Le système de type biomètre doit être fermé pour éviter toute entrée d'air par diffusion.

1.9.1.6. *Conditions d'incubation dans les sols de rizière*

Pour étudier la transformation dans les sols de rizière, le sol est recouvert d'une couche d'eau de 1-5 cm environ et la substance d'essai appliquée à la phase aqueuse (9). Une profondeur de couche de sol de 5 cm au moins est recommandée. Le système est ventilé avec de l'air comme en situation aérobie. Le pH, la concentration en oxygène et le potentiel redox de la couche aqueuse doivent être surveillés et enregistrés. Une période de préincubation de deux semaines au moins est nécessaire avant de commencer les études de transformation (voir le point 1.8.3.2).

1.9.1.7. *Durée de l' essai*

En règle générale, les études des taux et des voies de transformation ne doivent pas dépasser 120 jours ([2]) (3) (6) (8), parce qu'au-delà, dans un système artificiel en laboratoire qui ne peut se reconstituer naturellement, on peut attendre une diminution de l'activité microbienne du sol avec le temps. S'il est nécessaire de caractériser la déplétion de la substance d'essai et la formation et la déplétion des principaux produits de transformation, les études peuvent être poursuivies pendant une période plus longue (de 6 à 12 mois) (8). Des périodes d'incubation plus longues doivent être justifiées dans le rapport d'essai et accompagnées de mesures de la biomasse pendant et à la fin de ces périodes.

1.9.2. **Exécution de l'essai**

On place 50 à 200 g de sol environ (sur la base du poids sec) dans chaque flacon d'incubation (voir les figures 1 et 2 à l'annexe 3) et on traite le sol avec la substance d'essai en utilisant l'une des méthodes décrites au point 1.8.2. Si l'on utilise des solvants organiques pour appliquer la substance d'essai, il convient de les éliminer du sol par évaporation. Puis, le sol est soigneusement mélangé à l'aide d'une spatule et/ou en agitant le flacon. Si l'étude est menée dans des conditions de sol de rizière, le sol et l'eau doivent être soigneusement mélangés après l'application de la substance d'essai. De petits aliquots (1 g par exemple) des sols traités doivent être analysés pour mesurer la substance d'essai afin de vérifier l'uniformité de la répartition. D'autres méthodes sont décrites ci-dessous.

([1]) Les conditions aérobies sont prédominantes dans les sols de surface et même dans les sols subsurfaciques comme le montre un projet de recherche financé par PUE [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil températures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., p. 270-277, 17-21 août 1992, Sigtuna, Suède]. Les conditions anaérobies ne peuvent se produire qu'occasionnellement sur des sols inondés après d'importantes chutes de pluie ou sur des sols de rizières submergées.

([2]) Les études aérobies doivent être terminées en moins de 120 jours sous réserve que la voie de transformation et la minéralisation se soient effectivement produites à cette date. Il est possible de mettre fin à l'essai au bout de 120 jours, ou lorsque 90 % au moins de la substance d'essai sont transformés, mais seulement s'il y a formation de 5 % de CO_2 au moins.

▼B

Le taux de traitement doit correspondre à la dose d'application la plus élevée d'un produit phytosanitaire recommandée dans les instructions d'utilisation et à l'incorporation uniforme à une profondeur appropriée dans le champ [couche supérieure du sol sur 10 cm ([1])]. Par exemple, pour les substances chimiques appliquées sur le feuillage ou sans enfouissement dans le sol, la profondeur appropriée pour calculer la quantité de substance chimique à ajouter à chaque flacon est de 2,5 cm. Pour les substances chimiques enfouies dans le sol, la profondeur appropriée est la profondeur d'enfouissement spécifiée dans les instructions d'utilisation. Pour les substances chimiques courantes, la dose d'application doit être estimée sur la base de la voie de pénétration la plus pertinente; par exemple, lorsque les boues d'épuration sont la principale voie de pénétration dans le sol, la substance chimique doit être dosée dans la boue à une concentration correspondant à la concentration prévue et la quantité de boue ajoutée au sol doit correspondre à la charge normale en boue des sols agricoles. Si cette concentration n'est pas suffisamment élevée pour identifier les principaux produits de transformation, l'incubation d'échantillons de sol contenant des taux plus élevés peut être utile, mais il convient d'éviter des taux excessifs qui influencent les fonctions microbiennes du sol (voir les points 1.5 et 1.8.2).

Un autre moyen consiste à traiter un lot plus important (de 1 à 2 kg) de sol avec la substance d'essai, en le mélangeant soigneusement dans un mélangeur adapté puis en le transférant en petites fractions de 50 à 200 g dans les flacons d'incubation (par exemple à l'aide de répartiteurs). De petits aliquots (1 g par exemple) du lot de sol traité doivent être analysés afin de vérifier l'uniformité de la répartition de la substance d'essai. Cette procédure est préférable car elle permet une répartition plus uniforme de la substance d'essai dans le sol.

De même, les échantillons de sol non traités sont incubés dans les mêmes conditions (aérobies) que les échantillons traités avec la substance d'essai. Ces échantillons sont utilisés pour mesurer la biomasse pendant le déroulement et à la fin des essais.

Lorsque la substance d'essai est appliquée dans le sol dissous dans un (ou plusieurs) solvant(s) organique(s), des échantillons de sol traité avec la même quantité de solvant(s) sont incubés dans les mêmes conditions (aérobies) que les échantillons traités avec la substance d'essai. Ces échantillons sont utilisés pour mesurer la biomasse au début, pendant le déroulement et à la fin des essais afin de contrôler les effets du(des) solvant(s) sur la biomasse microbienne.

Les flacons contenant le sol traité sont attachés au système à circulation continue décrit à la figure 1 ou fermés par la colonne d'absorption présentée dans la figure 2 (voir l'annexe 3).

([1]) Calcul de la concentration initiale en fonction de la superficie à l'aide de l'équation suivante:

$$C_{sol}[mg/kg_{sol}] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^6[mg/kg]}{l[m] \cdot 10^4[m^2/ha] \cdot d[kg_{sol}/m^3]}$$

C_{sol} = concentration initiale dans le sol [mg.kg-^{1}]
A = Taux d'application [kg.ha-^{1}]; 1 = épaisseur de la couche de sol du champ [m]; d = densité apparente du sol sec [kg-m-^{3}].
En règle générale, si on applique un taux de 1 kg.ha-^{1}, on obtient une concentration de 1 mg.kg-^{1} environ dans une couche de 10 cm (en supposant une densité apparente de 1 g.cm-^{3}).

▼B

1.9.3. **Échantillonnage et mesures**

Les flacons d'incubation en deux exemplaires sont retirés à des intervalles appropriés et les échantillons de sol extraits à l'aide de solvants appropriés de polarité différente et analysés pour mesurer la substance d'essai et/ou les produits de transformation. Une étude bien conçue comprend un nombre suffisant de flacons de façon à pouvoir sacrifier deux flacons à chaque prélèvement. De plus, des solutions d'absorption ou des matériaux d'absorption solides sont retirés à différents intervalles de temps (tous les 7 jours au cours du premier mois et, au bout d'un mois, tous les 17 jours) pendant et à la fin de l'incubation de chaque échantillon de sol et analysés pour mesurer les produits volatils. Par ailleurs, au moins 5 points supplémentaires de prélèvement devraient être prévus en plus de l'échantillon de sol prélevé directement après application (échantillon de 0 jour). Les intervalles de temps doivent être choisis de façon à pouvoir établir la courbe de déplétion de la substance d'essai et les courbes de formation et de déplétion des produits de transformation (par exemple 0, 1, 3, 7 jours; 2, 3 semaines; 1, 2, 3 mois, etc.).

Lorsqu'on utilise une substance d'essai marquée au ^{14}C, la radioactivité non extractible est quantifiée par combustion et un bilan massique est calculé pour chaque intervalle de prélèvement.

Dans le cas de l'incubation anaérobie et des sols de rizière, la phase sol et la phase aqueuse peuvent être analysées ensemble pour mesurer la substance d'essai et les produits de transformation ou séparées par filtration ou centrifugation avant extraction et analyse.

1.9.4. **Essais facultatifs**

Il peut être utile d'effectuer des études aérobies non stériles à d'autres températures et humidités de sol pour estimer l'influence de la température et de l'humidité du sol sur le taux de transformation d'une substance d'essai et/ou de ses produits de transformation dans le sol.

On peut essayer d'effectuer une caractérisation plus poussée de la radioactivité non extractible en utilisant, par exemple, l'extraction par un fluide supercritique.

2. **DONNÉES**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Les quantités de substance d'essai, de produits de transformation, de substances volatiles (en % uniquement) et non extractibles doivent être données en pourcentage de la concentration initiale appliquée et, s'il y a lieu, en $mg.kg^{-1}$ de sol (sur la base du poids sec de sol) à chaque intervalle de prélèvement. Pour chaque intervalle de prélèvement, un bilan massique doit être donné en pourcentage de la concentration initiale appliquée. La représentation graphique des concentrations de la substance d'essai en fonction du temps permet d'estimer sa durée de demi-vie de la transformation ou sa DT_{50}. Les produits de transformation principaux doivent être identifiés et leurs concentrations doivent également être présentées graphiquement en fonction du temps afin de montrer leurs taux de formation et de déplétion. On entend par produit de transformation principal tout produit représentant > 10 % de la dose appliquée à n'importe quel moment de l'étude.

Les produits volatils piégés donnent une indication du potentiel de volatilité d'une substance d'essai et de ses produits de transformation à partir du sol.

▼B

Il est possible de déterminer avec plus de précision les demi-vies ou les valeurs DT_{50} et, s'il y a lieu, les valeurs DT_{75} et DT_{90} en utilisant des méthodes de calcul fondées sur des modèles cinétiques appropriés. La durée de demi-vie et les valeurs DT_{50} doivent être notées dans le rapport avec la description du modèle cinétique utilisé, l'ordre de la cinétique et le coefficient de détermination (r^2). La cinétique du premier ordre est préférable sauf si $r^2 < 0,7$. Si nécessaire, les calculs doivent aussi être appliqués aux principaux produits de transformation. Des exemples des modèles appropriés sont décrits sous les références 31 à 35.

Dans le cas des études de taux effectuées à des températures différentes, les taux de transformation doivent être décrits comme fonction de la température à l'intérieur de l'intervalle de température de l'expérience en appliquant la formule de la relation d'Arrhenius:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ or } \ln k = 1nA - \frac{B}{T}$$

où In A et B sont des constantes de régression, respectivement, l'intersection et la pente de la droite d'interpolation produite par régression linéaire de In k par rapport à 1/T, où k est la constante de vitesse à la température T et T la température en degrés Kelvin. Il convient de prendre soin à l'intervalle limité de température à l'intérieur de laquelle la relation d'Arrhenius est valable dans le cas où la transformation dépend de l'activité microbienne.

2.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Bien que les études soient effectuées dans un système artificiel en laboratoire, les résultats permettent d'estimer le taux de transformation de la substance d'essai ainsi que les taux de formation et de déplétion des produits de transformation dans des conditions de terrain (36) (37).

L'étude des voies de transformation d'une substance d'essai donne des informations sur la façon dont la structure de la substance appliquée est modifiée dans le sol par des réactions chimiques et microbiennes.

3. **RAPPORT**

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes:

Substance d'essai:

— nom courant, nom chimique, numéro de fichier CAS, formule structurale [indiquant la(les) position (s) du(des) marquage(s) lorsqu'on utilise un produit radiomarqué] et propriétés physico-chimiques pertinentes (voir le point 1.5),

— pureté (impuretés) de la substance d'essai,

— pureté radiochimique de la substance marquée et activité spécifique (s'il y a lieu).

Substances de référence:

— nom et structure chimique des substances de référence utilisées pour caractériser et/ou identifier le produit de transformation.

Sol d'essai:

— détails du site de prélèvement,

— date et procédure d'échantillonnage du sol,

▼B

— propriétés des sols: pH, teneur en carbone organique, texture (% sable, % limon, % argile), capacité d'échange cationique, densité apparente, caractéristique de rétention d'eau, et biomasse microbienne,

— durée et conditions de stockage du sol (s'il y a lieu).

Conditions d'essai:

— dates de réalisation des études,

— quantité de substance d'essai appliquée,

— solvants utilisés et méthode d'application de la substance d'essai,

— poids de sol traité initialement et prélevé à chaque intervalle pour analyse,

— description du système d'incubation utilisé,

— débit d'écoulement de l'air (pour les systèmes à circulation continue uniquement),

— température au début de l'expérience,

— teneur en humidité du sol pendant l'incubation,

— biomasse microbienne au début, pendant le déroulement et à la fin des études aérobies,

— pH, concentration en oxygène et potentiel redox au début, pendant le déroulement et à la fin des études anaérobies et des sols de rizière,

— méthode(s) d'extraction,

— méthodes de quantification et d'identification de la substance d'essai et des principaux produits de transformation dans le sol et matériau d'absorption,

— nombre de réplicats et nombre de témoins.

Résultats:

— résultat de la détermination de l'activité microbienne,

— reproductibilité et sensibilité des méthodes analytiques utilisées,

— taux de récupération (les pourcentages acceptables pour que l'étude soit valable sont présentés au point 1.7.1),

— tableaux de résultats exprimés en % de la dose initiale appliquée et, s'il y a lieu, en $mg.kg^{-1}$ de sol (sur la base de poids sec),

— bilan massique pendant et à la fin des études,

— caractérisation de la radioactivité non extractible (liée) ou des résidus dans le sol,

— quantification du CO_2 dégagé et des autres composés volatiles,

— graphes représentant la concentration de la substance d'essai dans le sol en fonction du temps et, s'il y a lieu, des principaux produits de transformation,

— demi-vie ou DT_{50}, DT_{75} et DT_{90} pour la substance d'essai et, s'il y a lieu, des principaux produits de transformation, ainsi que les limites de confiance,

▼B

— estimation de la vitesse de dégradation abiotique dans des conditions stériles,

— évaluation de la cinétique de transformation de la substance d'essai et, s'il y a lieu, des principaux produits de transformation,

— voies de transformation proposées, s'il y a lieu,

— discussion et interprétation des résultats,

— données brutes (chromatogramme des échantillons, calcul des vitesses de transformation des échantillons et moyens utilisés pour identifier les produits de transformation).

4. **RÉFÉRENCES**

(1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(3) Union européenne (UE) (1995). Directive 95/36/CE de la Commission du 14 juillet 1995 modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques. Annexe II, partie A, et annexe III, partie A: Devenir et comportement dans l'environnement.

(4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(5) BBA (1986). Richtlinie fur die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden — Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

(6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil — Part 1: Aerobic conditions.

(7) ISO 14239 (1997). Soil Quality — Laboratory incubation Systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(9) MAFF — Japon 2000 — Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil — Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

(10) OCDE (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italie, 18-20 January 1995.

(11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academie Press, p. 123-157.

(12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley — VCH (1998).

(13) T.R. Roberts: Non extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(14) Ligne directrice de l'OCDE 304 A: Biodégradabilité intrinsèque dans le sol (adoptée le 12 mai 1981).

▼B

(15) ISO 10381-6 (1993). Qualité des sols — Échantillonnage — Partie 6: Guide du prélèvement, de la manipulation et du stockage des sols pour l'évaluation des processus microbiens en laboratoire.

(16) Annexe V de la directive 67/548/CEE.

(17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, p. 85-114.

(18) Soil Texture Classification (US and FAO Systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Kliite, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemicai and physical méthodes of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

(23) Schefïer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, p. 215-221.

(25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

(26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, p. 45-60.

(27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio- transformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, p. 105-120.

(28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).

(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).

(30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, p. 197-200.

(31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, p. 141-146.

▼B

(32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, p. 181-199.

(33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In «Environmental Dynamics of Pesticides». R. Haque and V.H. Freed, Eds., p. 135-172.

(34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide résidus. II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 39, p. 188-204.

(35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 33, p. 47-60.

(36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, p. 1032-1041.

(37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, p. 83-122.

▼B

Annexe 1

SUCCION, CAPACITÉ AU CHAMP (FC) ET CAPACITÉ DE RÉTENTION D'EAU (WHC) [1]

Hauteur de la colonne d'eau [cm]	pF [a]	bar [b]	Remarques
10^7	7	10^4	Sol sec
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	Point de flétrissement
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2,8	0,6	
$3{,}3 \cdot 10^2$	2,5	0,33 [c]	Échelle de la capacité au champ [d]
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	Capacité de rétention d'eau (approximation)
1	0	0,001	Sol saturé en eau

[a] pF = log de la colonne d'eau en cm.
[b] 1 bar = 10^5 Pa.
[c] Correspond à une teneur en eau approximative de 10 % dans le sable, de 35 % dans le limon et de 45 % dans l'argile.
[d] La capacité au champ n'est pas constante mais varie selon le type de sol de pF 1,5 à 2,5.

La *succion* est mesurée en cm de colonne d'eau ou en bar. Comme l'échelle de valeur de la succion est très large, celle-ci est exprimée simplement en pF, qui est égal au logarithme de la colonne d'eau en cm.

La *capacité au champ* (FC) est définie comme la quantité d'eau qui peut être stockée contre la gravité par un sol naturel 2 jours après une longue période de pluie ou après une irrigation suffisante. Elle est déterminée dans un sol non brassé in situ dans le champ. Cette mesure ne peut donc pas s'appliquer aux échantillons de sol brassé. Les valeurs de capacité au champ déterminées dans les sols brassés peuvent présenter une variabilité systématique importante.

La *capacité de rétention d'eau* (WHC) est déterminée en laboratoire avec un sol non brassé et un sol brassé en saturant une colonne de sol avec de l'eau par capillarité. Elle est particulièrement utile pour les sols brassés et peut être jusqu'à 30 % supérieure à la capacité au champ (1). Elle est également plus facile à déterminer expérimentalement que des valeurs de capacité au champ fiables.

Notes

[1] Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

Annexe 2

TENEUR EN HUMIDITÉ (g d'eau pour 100 g de sol sec) DE DIFFÉRENTS TYPES DE SOL PROVENANT DE DIFFÉRENTS PAYS

Type de sol	Pays	Teneur en humidité à		
		WHC ([1])	pF = 1,8	pF = 2,5
Sable	Allemagne	28,7	8,8	3,9
Sable limoneux	Allemagne	50,4	17,9	12,1
Sable limoneux	Suisse	44,0	35,3	9,2
Limon fin	Suisse	72,8	56,6	28,4
Limon argileux	Brésil	69,7	38,4	27,3
Limon argileux	Japon	74,4	57,8	31,4
Limon sableux	Japon	82,4	59,2	36,0
Limon fin	États-Unis	47,2	33,2	18,8
Limon sableux	États-Unis	40,4	25,2	13,3

([1]) Capacité de rétention d'eau

▼B

Annexe 3

Figure 1

Exemple d'appareil à circulation continue pour étudier la transformation des substances chimiques dans le sol ([1]) ([2])

1: robinet à pointeau

2: bouteille de lavage du gaz contenant de l'eau

3: ultramembrane (conditions stériles uniquement), taille de pore 0,2 µm

4: flacon pour le métabolisme du sol (saturé en eau uniquement pour les conditions anaérobies et de rizière)

5: piège à éthylène glycol pour les composés volatils organiques

6: piège à acide sulfurique pour les composés alcalins volatils

7, 8: piège d'hydroxyde de sodium pour le CO_2 & autres acides volatils

9: débitmètre

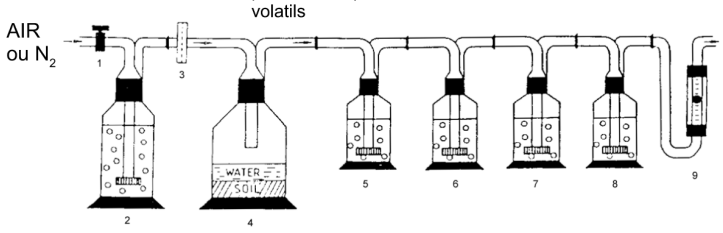
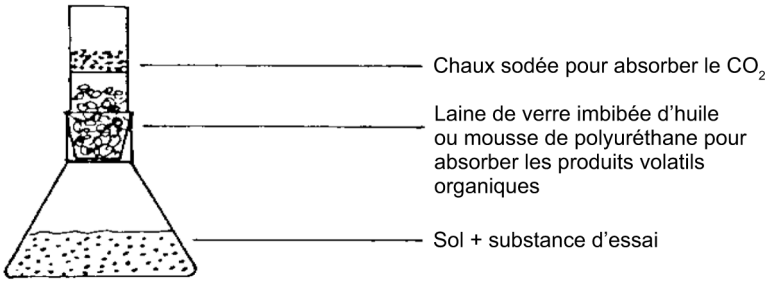


Figure 2

Exemple de flacon de type biomètre pour l'étude de la transformation des substances chimiques dans le sol ([3])



([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academie Press, p. 123-157.

([2]) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, p. 85-114.

([3]) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, p. 141-146.

▼B

C.24. TRANSFORMATION AÉROBIE ET ANAÉROBIE DANS LES SYSTÈMES SÉDIMENTAIRES AQUATIQUES

1. MÉTHODE

La présente méthode d'essai reprend l'essai TG 308 (2002) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

Les substances chimiques peuvent pénétrer dans les eaux de surface peu ou très profondes par des voies telles que l'application directe, la déperdition lors de l'épandage, le ruissellement, le drainage, l'élimination des déchets, les effluents industriels, domestiques ou agricoles et le dépôt atmosphérique. La présente méthode d'essai décrit une méthode de laboratoire conçue pour évaluer la transformation aérobie et anaérobie des substances chimiques organiques dans les systèmes sédimentaires aquatiques. Elle s'appuie sur les lignes directrices existantes (1) (2) (3) (4) (5) (6). Un atelier de l'OCDE sur la sélection des sols et des sédiments, qui s'est tenu à Belgirate, en Italie, en 1995 (7), a défini notamment le nombre et le type de sédiments à utiliser dans le cadre de cet essai. Il a également formulé des recommandations relatives au prélèvement, à la manipulation et au stockage des échantillons de sédiments, sur la base des lignes directrices de l'ISO (8). Ces études sont nécessaires pour les substances chimiques qui sont introduites directement dans l'eau ou qui sont susceptibles de pénétrer dans le milieu aquatique par les voies décrites ci-dessus.

La phase aqueuse supérieure des systèmes sédimentaires aquatiques présente souvent des conditions aérobies. La couche superficielle du sédiment peut être aérobie ou anaérobie, alors que, en profondeur, le sédiment est généralement anaérobie. Afin de tenir compte de toutes ces possibilités, le présent document décrit des essais aérobies et anaérobies. L'essai aérobie simule une colonne d'eau aérobie sur une couche de sédiment aérobie et une sous-couche avec un gradient anaérobie. L'essai anaérobie simule un système eau-sédiment complètement anaérobie. Si, selon les circonstances, il est nécessaire de s'écarter sensiblement de ces recommandations, par exemple en utilisant des carottes de sédiment intact ou des sédiments qui ont pu être exposés à la substance d'essai, il existe d'autres méthodes à cette fin (9).

1.2. DÉFINITIONS

Il convient d'utiliser dans tous les cas les unités standard internationales (SI).

Substance d'essai: toute substance, qu'il s'agisse de la substance mère ou des produits de transformation correspondants.

Produits de transformation: toutes les substances résultant des réactions de transformation biotiques et abiotiques de la substance d'essai, et notamment le CO_2 et les résidus liés.

Résidus liés: les «résidus liés» désignent des composés du sol, végétaux ou animaux, qui subsistent dans la matrice après extraction, sous la forme de la substance mère ou de ses métabolite(s). La méthode d'extraction ne doit pas modifier de manière substantielle les composés eux-mêmes ni la structure de la matrice. La nature de la liaison peut être clarifiée en partie par les méthodes d'extraction qui modifient la matrice et des techniques analytiques sophistiquées. C'est de cette façon que l'on a déterminé jusqu'ici la nature de la liaison, covalente ionique, par sorption ou piégeage. De manière générale, la formation de résidus liés abaisse sensiblement la bioaccessibilité et la biodisponibilité (10) [modifié d'après l'UICPA 1984 (11)].

▼B

Transformation aérobie: (oxydation): réaction se produisant en présence d'oxygène moléculaire (12).

Transformation anaérobie: (réduction): réaction se produisant en l'absence d'oxygène moléculaire (12).

Eaux naturelles: eaux superficielles provenant de mares, rivières, fleuves, etc.

Sédiment: mélange de constituants chimiques minéraux et organiques, ces derniers contenant des composés à haute teneur en carbone et en azote et à masse moléculaire élevée. Il est déposé par les eaux naturelles avec lesquelles il forme une interface.

Minéralisation: dégradation complète d'un composé organique en CO_2 et H_2O dans des conditions aérobies, et en CH_4, CO_2 et H_2O dans des conditions anaérobies. Dans le cadre de la présente méthode d'essai, lorsqu'on utilise un composé radiomarqué, la minéralisation désigne la dégradation importante au cours de laquelle un atome de carbone marqué est oxydé ou réduit quantitativement avec dégagement de la quantité correspondante de $^{14}CO_2$ ou de $^{14}CH_4$, respectivement.

Demi-vie, $t_{0,5}$, temps nécessaire à la transformation de 50 % d'une substance d'essai lorsque la transformation peut être décrite par une cinétique du premier ordre; elle est indépendante de la concentration initiale.

DT_{50} (temps de dégradation 50): période au cours de laquelle la concentration initiale de la substance d'essai diminue de 50 %.

DT_{75} (temps de dégradation 75): période au cours de laquelle la concentration initiale de la substance d'essai diminue de 75 %.

DT_{90} (temps de dégradation 90): période au cours de laquelle la concentration initiale de la substance d'essai diminue de 90 %.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Des substances de référence doivent être utilisées pour caractériser et/ou identifier les produits de transformation par des méthodes spectroscopiques et chromatographiques.

1.4. INFORMATIONS RELATIVES À LA SUBSTANCE D'ESSAI

Une substance d'essai marquée ou non marquée peut être utilisée pour mesurer le taux de transformation, bien qu'il soit préférable d'utiliser du matériel marqué. Il est nécessaire d'utiliser du matériel marqué pour étudier les voies de transformation et établir un bilan massique, le marquage au ^{14}C est recommandé mais l'utilisation d'autres isotopes, comme ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P, peut aussi être utile. Dans la mesure du possible, le-marquage doit être situé dans la partie(s) la plus stable de la molécule ([1]). La substance d'essai doit avoir une pureté chimique et/ou radiochimique d'au moins 95 %.

Avant de procéder à un essai, il convient de disposer des informations suivantes sur la substance d'essai:

a) solubilité dans l'eau (Méthode A.6);

b) solubilité dans les solvants organiques;

c) pression de vapeur (Méthode A.4) et constante de la loi de Henry;

([1]) Par exemple, si la substance d'essai contient un cycle, il est nécessaire de marquer ce cycle; si la substance d'essai contient deux cycles ou plus, il peut être nécessaire d'effectuer des études distinctes pour évaluer le devenir de chaque cycle marqué et obtenir des informations fiables sur la formation de produits de transformation.

▼B

d) coefficient de partage n-octanol/eau (Méthode A.8);

e) coefficient d'adsorption (K_d, K_r ou K_{oc}, s'il y a lieu) (Méthode C.18);

f) hydrolyse (Méthode C.7);

g) constante de dissociation (pK_a) [ligne directrice 112 de l'OCDE] (13);

h) structure chimique de la substance d'essai et position des marqueurs isotopiques, s'il y a lieu.

Note: Il convient d'indiquer la température à laquelle ces mesures ont été effectuées.

Il peut également être utile de disposer d'informations sur la toxicité de la substance d'essai sur les micro-organismes, sur la biodégradabilité immédiate et/ou intrinsèque, ainsi que sur la transformation aérobie et anaérobie dans le sol.

Il faut disposer des méthodes analytiques (dont des méthodes d'extraction et de purification) nécessaires à la quantification et à l'identification de la substance d'essai et de ses produits de transformation dans l'eau et dans les sédiments (voir le point 1.7.2).

1.5. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La méthode décrite ici emploie un système sédimentaire aquatique aérobie et anaérobie (voir l'annexe 1) qui permet:

i) de mesurer le taux de transformation de la substance d'essai dans le sédiment;

ii) de mesurer le taux de transformation de la substance d'essai dans le sédiment;

iii) de mesurer le taux de minéralisation de la substance d'essai et/ou de ses produits de transformation (lorsqu'on utilise une substance d'essai marquée au ^{14}C);

iv) d'identifier et de quantifier les produits de transformation dans les phases aqueuse et sédimentaire et notamment le bilan massique (lorsqu'on utilise une substance d'essai marquée);

v) de mesurer la répartition de la substance d'essai et de ses produits de transformation entre les deux phases pendant une période d'incubation dans le noir (pour éviter, par exemple, la prolifération d'algues) à température constante. Les durées de demi-vie, les valeurs DT_{50}, DT_{75} et DT_{90} sont déterminées lorsque les données le permettent, mais elles ne doivent pas être extrapolées bien au-delà de la période expérimentale (voir le point 1.2).

Au moins deux sédiments et les phases aqueuses associées sont nécessaires pour les études aérobies et anaérobies respectivement (7). Il peut toutefois être nécessaire dans certains cas d'utiliser plus de deux sédiments aquatiques, par exemple, pour une substance chimique pouvant être présente dans l'eau douce et/ou le milieu marin.

▼B

1.6. APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

La méthode peut être appliquée aux substances chimiques (marquées ou non marquées) pour lesquelles il existe une méthode analytique de précision et de sensibilité suffisantes. Elle s'applique à des composés faiblement volatils, non volatils, hydrosolubles ou peu hydrosolubles. L'essai ne doit pas être appliqué aux substances chimiques fortement volatiles dans l'eau (fumigants, solvants organiques) et qui ne peuvent donc pas être gardées dans l'eau et/ou le sédiment dans les conditions expérimentales de cet essai.

La méthode a été appliquée jusqu'ici pour étudier la transformation des substances chimiques dans les eaux douces et dans les sédiments, mais, en principe, elle peut également être appliquée aux systèmes estuariens/marins. Elle n'est pas adaptée à la simulation des conditions de l'eau courante (rivières) ou de pleine mer.

1.7. CRITÈRES DE QUALITÉ

1.7.1. **Récupération**

L'extraction et l'analyse, au moins en double exemplaire, des échantillons d'eau et de sédiment immédiatement après l'addition de la substance d'essai donnent une première indication de la reproductibilité de la méthode analytique et de l'uniformité de la procédure d'application de la substance d'essai. Les taux de récupération des stades ultérieurs des expériences sont fournis par les bilans massiques respectifs (lorsqu'on utilise une substance marquée). Les taux de récupération doivent osciller entre 90 % et 110 % pour les substances chimiques marquées (6) et entre 70 % et 110 % pour les substances chimiques non marquées.

1.7.2. **Reproductibilité et sensibilité de la méthode analytique**

La reproductibilité de la méthode analytique (à l'exception du rendement d'extraction initial) servant à quantifier la substance d'essai et les produits de transformation peut être contrôlée en effectuant en double les analyses du même extrait d'échantillons d'eau ou de sédiments, incubés suffisamment longtemps pour permettre la formation de produits de transformation.

La limite de détection de la méthode d'analyse de la substance d'essai et ses produits de transformation doit être au moins égale à 0,01 $mg.kg^{-1}$ dans l'eau ou le sédiment (substance d'essai) ou à 1 % de la quantité initiale appliquée à un système d'essai si cette quantité est inférieure. La limite de quantification doit également être spécifiée.

1.7.3. **Précision des données de transformation**

L'analyse de régression des concentrations de la substance d'essai en fonction du temps permet d'obtenir les informations appropriées sur la précision de la courbe de transformation et de calculer les limites de confiance des demi-vies (en cas de cinétique du pseudo premier ordre) ou des valeurs DT_{50} et, le cas échéant, des valeurs DT_{75} et DT_{90}.

1.8. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.8.1. **Système et appareillage d'essai**

L'étude doit être effectuée dans des récipients en verre (bouteilles, tubes de centrifugation), à moins que les informations préliminaires (coefficient de partage n-octanol/eau, données de sorption, etc.) indiquent que la substance d'essai risque d'adhérer au verre, auquel cas on peut envisager l'utilisation d'un autre matériau (Téflon). Lorsque l'on sait que la substance d'essai adhère au verre, il est possible de contourner le problème en utilisant l'une des méthodes suivantes:

▼B

— déterminer la masse de la substance d'essai et de ses produits de transformation sorbés sur le verre,

— veiller à nettoyer toute la verrerie à l'aide d'un solvant à la fin de l'essai,

— utilisation de produits formulés (voir également le point 1.9.2),

— utilisation d'une quantité croissante de cosolvant pour ajouter la substance d'essai au système; si l'on utilise un cosolvant, celui-ci ne doit pas entraîner de réaction de solvolyse avec la substance d'essai.

Des exemples d'appareillage d'essai courant (systèmes à flux continu et biomètres) sont présentés dans les annexes 2 et 3, respectivement (14). On trouvera d'autres systèmes d'incubation sous la référence 15. L'appareil utilisé pour l'expérience doit permettre l'échange d'air ou d'azote et le piégeage des produits volatils. Les dimensions de l'appareillage doivent permettre de satisfaire aux exigences de l'essai (voir le point 1.9.1). La ventilation peut être effectuée soit par léger barbotage soit en faisant circuler de l'air ou de l'azote à la surface de l'eau. Dans ce cas, il est conseillé de remuer doucement la surface de l'eau pour obtenir une meilleure répartition de l'oxygène ou de l'azote dans l'eau. Il ne faut pas utiliser d'air sans CO_2 car cela pourrait entraîner une augmentation du pH de l'eau. Dans les deux cas, il n'est pas souhaitable de toucher au sédiment et il convient de l'éviter dans toute la mesure du possible. Les substances chimiques faiblement volatiles doivent être testées dans un système de type biomètre en remuant légèrement la surface de l'eau. Des récipients fermés avec un espace libre d'air atmosphérique ou d'azote et des fioles à l'intérieur pour le piégeage des produits volatils peuvent également être utilisés (16). Un bon échange du gaz de surface est nécessaire dans l'essai aérobie afin de compenser la consommation d'oxygène par la biomasse.

La liste non restrictive des pièges adaptés à la collecte des produits de transformation volatils est la suivante: solutions à 1 $mol.dm^{-3}$ d'hydroxyde de potassium ou d'hydroxyde de sodium pour le dioxyde de carbone ([1]) et éthylène glycol, éthanolamine ou 2 % paraffine dans le xylène pour les composés organiques. Les produits volatils formés en anaérobie, comme le méthane, peuvent être récupérés, par exemple, à l'aide de tamis moléculaires. Ces produits volatils peuvent être brûlés, par exemple, en CO_2 en faisant passer le gaz à travers un tube de quartz rempli de CuO à la température de 900 ^{o}C et en piégeant le CO_2 formé dans une colonne d'absorption contenant un produit alcalin (17).

Des instruments de laboratoire pour l'analyse chimique de la substance d'essai et des produits de transformation sont nécessaires [chromatographie gaz-liquide (GLQ), chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), chromatographie en couche mince (TLC), spectroscopie de masse (MS), chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), résonance magnétique nucléaire (RMN), etc.], ainsi que, le cas échéant, des dispositifs de détection des substances chimiques radiomarquées ou non marquées. Lorsqu'on utilise des substances radiomarquées, un compteur à scintillation liquide et un appareil d'oxydation pour la combustion (pour la combustion des échantillons de sédiment avant l'analyse de radioactivité) sont également nécessaires.

D'autres équipements courants de laboratoire peuvent s'avérer nécessaires selon le cas pour effectuer des analyses physico-chimiques et biologiques (voir le tableau 1 du point 1.8.2.2), ainsi que de la verrerie, des produits chimiques et des réactifs.

([1]) Comme ces solutions d'absorption alcalines absorbent également le dioxyde de carbone de l'air de ventilation et de l'air formé par la respiration dans les expériences aérobies, il convient de les changer à intervalles réguliers afin d'éviter leur saturation et par conséquent la perte de leur capacité d'absorption.

▼B

1.8.2. **Sélection et nombre de sédiments aquatiques**

Les sites de prélèvement doivent être choisis en fonction de la finalité de l'essai dans une situation donnée. Pour choisir les sites de prélèvement, il convient de prendre en compte l'historique des éventuels apports agricoles, industriels ou domestiques dans le bassin versant et les eaux en amont. Les sédiments ne doivent pas être utilisés s'ils ont été contaminés par la substance d'essai ou ses analogues structuraux au cours des quatre années précédentes.

1.8.2.1. **Sélection des sédiments**

On utilise généralement deux sédiments pour les études aérobies (7). Les deux sédiments sélectionnés doivent différer en texture et en teneur en carbone organique. Un sédiment doit avoir une teneur élevée en carbone organique (2,5-7,5 %) et une texture fine, et l'autre doit avoir une teneur en carbone organique peu élevée (0,5-2,5 %) et une texture grossière. La différence de teneur en carbone organique doit être normalement égale ou supérieure à 2 %. On entend par «texture fine» une teneur en [argile + limon] ([1]) > 50 % et par «texture grossière» une teneur en [argile + limon] < 50 %. La différence de teneur [argile + limon] entre les deux sédiments doit être normalement égale ou supérieure à 20 %. Dans le cas où des substances chimiques risquent d'entrer également en contact avec les eaux de mer, au moins un des deux systèmes eau-sédiment doit être d'origine marine.

Pour l'étude strictement anaérobie, deux échantillons de sédiments (ainsi que la phase aqueuse associée) doivent être prélevés dans les zones anaérobies des systèmes à eaux de surface (7). Les sédiments comme les phases aqueuses doivent être manipulés et transportés avec précaution en évitant tout contact avec l'oxygène.

D'autres paramètres peuvent présenter de l'importance dans la sélection des sédiments et ils doivent être envisagés cas par cas. Par exemple, le pH des sédiments est important pour tester les substances chimiques dont la transformation et/ou la sorption peuvent être dépendantes du pH. La dépendance au pH de la sorption peut être une conséquence du pK_a de la substance d'essai.

1.8.2.2. **Caractérisation des échantillons eau-sédiment**

Les paramètres clés qui doivent être mesurés et notés dans le rapport (en indiquant la méthode utilisée) pour l'eau et pour le sédiment, ainsi que l'étape de l'essai à laquelle ces paramètres doivent être déterminés, sont résumés dans le tableau ci-dessous. Pour information, les méthodes de détermination de ces paramètres sont fournies sous les références (18) (19) (20) (21).

Par ailleurs, il peut être nécessaire de mesurer et d'enregistrer d'autres paramètres selon le cas [eau douce: particules, alcalinité, dureté, conductivité, NO_3/PO_4 (rapport et valeurs individuelles); pour les sédiments: capacité d'échange cationique, capacité de rétention d'eau, carbonate, azote total et phosphore; pour les systèmes marins: salinité]. Il peut également être utile d'analyser les sédiments et l'eau pour mesurer le nitrate, le sulfate, le fer biodisponible, et d'autres accepteurs d'électrons peuvent aussi être utiles pour évaluer les conditions redox, notamment en ce qui concerne la transformation anaérobie.

([1]) [Argile + limon] est la fraction minérale du sédiment de granulométrie < 50 μm.

▼B

Paramètres mesurés pour la caractérisation des échantillons d'eau et de sédiment (7) (22) (23)

Paramètre	Étape de la procédure d'essai					
	prélèvement sur site	post-manipulation	début de l'acclimatation	début de l'essai	pendant l'essai	à la fin de l'essai
Eau						
Origine/source	x					
Température	x					
pH	x		x	x	x	x
Carbone organique total			x	x		x
Concentration O_2*	x		x	x	x	x
Potentiel redox*			x	x	x	x
Sédiment						
Origine/source	x					
Profondeur de la couche	x					
pH		x	x	x	x	x
Répartition de la taille des particules		x				
Carbone organique total		x	x	x		x
Biomasse microbienne (**)		x		x		x
Potentiel redox (*)	Observation (couleur/ odeur)		x	x	x	x

(*) Selon des résultats récents, les mesures des concentrations d'oxygène dans l'eau et des potentiels redox n'ont de valeur ni mécanique ni prédictive en ce qui concerne la croissance et le développement de colonies microbiennes dans les eaux superficielles (24) (25). La détermination de la demande biochimique en oxygène (lors du prélèvement, au début et à la fin de l'essai) et des concentrations de micro/macroéléments nutritifs Ca, Mg et Mn (au début et à la fin de l'essai) dans l'eau et la mesure du N total et du P total dans les sédiments (lors du prélèvement et à la fin de l'essai) peuvent être de meilleurs outils pour interpréter et évaluer les taux et les voies de biotransformation aérobie.

(**) Méthode du taux de respiration microbienne (26), méthode de fumigation (27) ou mesures de numération (bactéries, actinomycètes, champignons et colonies totales) pour les études aérobies; taux de méthanogenèse pour les études anaérobies.

1.8.3. **Prélèvement, manipulation et stockage**

1.8.3.1. *Prélèvement*

Il convient de se référer au projet de ligne directrice ISO sur l'échantillonnage des fonds sédimentaires (8) pour prélever les échantillons de sédiment. Les échantillons de sédiment doivent être prélevés sur la totalité de la couche supérieure de 5 à 10 cm du sédiment. L'eau correspondante doit être collectée sur le même site ou dans le même lieu et en même temps que le sédiment. Pour l'étude anaérobie, le sédiment et l'eau correspondante doivent être prélevés et transportés en évitant tout contact avec l'oxygène (28) (voir le point 1.8.2.1). Quelques dispositifs d'échantillonnage sont décrits dans la littérature (8) (23).

▼B

1.8.3.2. *Manipulation*

Le sédiment est séparé de l'eau par filtration et passé au travers d'un tamis de 2 mm en utilisant l'eau excédentaire prélevée sur le même site qui est ensuite éliminée. Des quantités connues de sédiments et d'eau sont ensuite mélangées dans le rapport désiré (voir le point 1.9.1) dans des flacons d'incubation et préparées pour la période d'acclimatation (voir le point 1.8.4). Pour l'étude anaérobie, toutes les étapes de la manipulation doivent être effectuées en l'absence d'oxygène (29) (30) (31) (32) (33).

1.8.3.3. *Stockage*

Il est vivement recommandé d'utiliser des sédiments et de l'eau fraîchement prélevés, mais si le stockage est nécessaire, le sédiment et l'eau doivent être tamisés comme décrit ci-dessus et stockés ensemble, recouverts d'eau (couche d'eau de 6-10 cm), dans l'obscurité, à 4 ± 2 °C[4] pendant une durée maximale de quatre semaines (7) (8) (23). Les échantillons destinés aux études aérobies doivent être stockés en laissant un accès libre à l'air (dans des récipients ouverts), alors que les échantillons destinés aux études anaérobies doivent être conservés en l'absence d'oxygène. Il ne faut pas que le sédiment et l'eau soient congelés ni que le sédiment sèche pendant le transport et le stockage.

1.8.4. **Préparation des échantillons de sédiment/eau pour l'essai**

Une période d'acclimatation doit être respectée avant d'ajouter la substance d'essai, au cours de laquelle chaque échantillon de sédiment/eau est placé dans le récipient d'incubation à utiliser dans l'essai principal, et l'acclimatation est réalisée exactement dans les mêmes conditions que l'incubation de l'essai (voir le point 1.9.1). La période d'acclimatation est le temps nécessaire pour atteindre une stabilité suffisante du système, en termes de pH, de concentration de l'oxygène dans l'eau, de potentiel redox du sédiment et de l'eau, et de séparation macroscopique des phases. La période d'acclimatation doit durer normalement de une à deux semaines et elle ne doit pas excéder quatre semaines. Le résultat des déterminations effectuées pendant cette période doit être enregistré.

1.9. RÉALISATION DE L'ESSAI

1.9.1. **Conditions de l'essai**

L'essai doit être effectué dans le dispositif d'incubation (voir le point 1.8.1) avec un rapport de volume eau/sédiment situé entre 3:1 et 4:1, et une couche sédimentaire de 2,5 cm (± 0,5 cm). ([1]) On recommande une quantité minimale de 50 g de sédiment (sur une base de poids sec) par récipient d'incubation.

L'essai doit être effectué dans le noir à température constante dans la fourchette de 10 à 30 °C. La température indiquée est de 20 ± 2 °C. Le cas échéant, une température supplémentaire plus basse (10 °C par exemple) peut être envisagée selon le cas, en fonction de l'information que l'on souhaite retirer de l'essai. La température d'incubation doit être surveillée et enregistrée.

([1]) Selon des études récentes, un stockage à 4 °C peut entraîner une diminution de la teneur en carbone organique du sédiment, ce qui risque d'entraîner une diminution de l'activité microbienne (34).

▼B

1.9.2. **Traitement et application de la substance d'essai**

Une seule concentration d'essai de la substance chimique est utilisée ([1]) Pour les produits phytosanitaires appliqués directement dans le milieu aquatique, le dosage maximal indiqué sur le mode d'emploi doit être pris comme taux maximal d'application calculé sur la base de la surface de l'eau dans le récipient d'essai. Dans tous les autres cas, la concentration à utiliser doit s'appuyer sur les estimations des émissions dans l'environnement. Il convient de veiller à appliquer une concentration de substance d'essai adéquate afin de caractériser la voie de transformation et la formation et le déclin des produits de transformation. Il peut être nécessaire d'appliquer des doses plus élevées (10 fois par exemple) dans le cas où les concentrations de la substance d'essai sont proches de la limite de détection au début de l'étude et/ou les principaux produits de transformation n'ont pas pu être facilement détectés à un taux égal à 10 % du taux d'application de la substance d'essai. Toutefois, si des concentrations d'essai plus élevées sont utilisées, celles-ci ne doivent pas avoir un effet négatif important sur l'activité microbienne du système eau-sédiment. Afin d'obtenir une concentration constante de la substance d'essai dans des récipients de dimensions différentes, il peut être indiqué d'ajuster la quantité de produit appliqué, en fonction de la profondeur de la colonne d'eau dans le récipient par rapport à la profondeur de l'eau dans le champ (que l'on suppose égale à 100 cm, mais on peut prendre une autre profondeur comme base). Voir l'annexe 4 pour un exemple de calcul.

Théoriquement, la substance d'essai doit être appliquée sous forme de solution aqueuse dans la phase aqueuse du système d'essai. S'il n'est pas possible de procéder autrement, on peut utiliser de faibles quantités de solvants miscibles avec l'eau (comme l'acétone ou l'éthanol) pour appliquer et répartir la substance d'essai, mais ce solubilisant ne doit pas dépasser 1 % v/v ni avoir d'effets négatifs sur l'activité microbienne du système d'essai. La solution aqueuse de la substance d'essai doit être préparée avec soin — afin d'assurer une homogénéité totale, on peut effectuer un prémélange et utiliser des colonnes de générateur. Après l'addition de la solution aqueuse au système d'essai, il est recommandé de remuer doucement la phase aqueuse en brassant le moins possible le sédiment.

Il n'est pas recommandé d'utiliser de manière routinière des produits formulés car les ingrédients de formulation risquent d'affecter la répartition de la substance d'essai et/ou des produits de transformation entre la phase aqueuse et la phase sédimentaire. Toutefois, dans le cas de substances peu solubles dans l'eau, l'utilisation de matériau formulé peut être une solution de remplacement appropriée.

Le nombre de récipients d'incubation dépend du nombre de temps de prélèvement (voir le point 1.9.3). Un nombre suffisant de systèmes d'essai doit être prévu de façon à pouvoir sacrifier deux systèmes à chaque temps de prélèvement. Lorsqu'on utilise des unités témoins de chaque système sédimentaire aquatique, ces unités ne doivent pas être traitées avec la substance d'essai. Les unités témoins peuvent être utilisées pour déterminer la biomasse microbienne du sédiment et le carbone organique total de l'eau et du sédiment à la fin de l'étude. Deux unités témoins (une unité de chaque sédiment aquatique) peuvent être utilisées pour surveiller les paramètres requis dans le sédiment et dans l'eau pendant la période d'acclimatation (voir le tableau du point 1.8.2.2). Deux témoins supplémentaires doivent être ajoutés lorsque la substance d'essai est appliquée au moyen d'un solvant afin de mesurer les effets négatifs sur l'activité microbienne du système d'essai.

([1]) Il peut être utile d'effectuer un essai avec une deuxième concentration pour les substances chimiques qui atteignent les eaux superficielles par différentes voies d'entrée, ce qui entraîne des concentrations très différentes, dans la mesure où la concentration la plus faible peut être analysée avec une précision suffisante.

▼B

1.9.3. **Durée de l'essai et échantillonnage**

L'expérience ne doit pas durer plus de 100 jours (6), et elle doit se poursuivre jusqu'à ce que les voies de dégradation et le profil de répartition eau/sédiment se soient établis ou lorsque 90 % de la substance d'essai s'est dissipée par transformation et/ou volatilisation. Le nombre de temps de prélèvement doit être au moins égal à six (y compris le temps zéro), et une étude préliminaire facultative (voir le point 1.9.4) est effectuée pour déterminer le régime de prélèvement et la durée de l'essai, à moins que l'on ne dispose de données suffisantes sur la substance d'essai d'après les études antérieures. Pour les substances hydrophobes, il peut être nécessaire d'effectuer des points de prélèvement complémentaires pendant la période initiale afin de déterminer le taux de répartition entre la phase aqueuse et la phase sédimentaire.

À chaque temps de prélèvement, les récipients d'incubation (réplicats) sont retirés pour analyse. Le sédiment et l'eau qui le recouvre sont analysés séparément ([1]). L'eau de surface doit être retirée avec précaution en évitant autant que possible de toucher au sédiment. L'extraction et la caractérisation de la substance d'essai et des produits de transformation doivent suivre les procédures analytiques appropriées. Il faut prendre soin d'éliminer les matières adsorbées sur les parois du récipient d'incubation et dans les tuyaux utilisés pour piéger les produits volatils.

1.9.4. **Essai préliminaire facultatif**

S'il n'est pas possible de prévoir la durée et le régime d'échantillonnage à partir d'autres études analogues sur la substance d'essai, il peut être indiqué d'effectuer un essai préliminaire, dans les mêmes conditions d'essai que les conditions proposées pour l'étude définitive. Si cet essai préliminaire est effectué, les conditions expérimentales et les résultats de l'essai doivent être décrits brièvement.

1.9.5. **Mesures et analyse**

La concentration de la substance d'essai et des produits de transformation à chaque temps de prélèvement dans l'eau et le sédiment doit être mesurée et enregistrée (en concentration et en pourcentage de la substance appliquée). En règle générale, tout produit de transformation détecté à > 10 % de la radioactivité totale appliquée au système eau/sédiment, quel que soit le temps de prélèvement, doit être identifié, à moins d'une justification suffisante. Les produits de transformation dont les concentrations sont en augmentation constante pendant la durée de l'étude doivent également être identifiés, même si leurs concentrations ne dépassent pas les limites indiquées ci-dessus, car cela peut indiquer une persistance. Des justifications doivent être fournies dans le rapport.

Les résultats des systèmes de piégeage des gaz/volatils (CO_2 et autres, à savoir les composés organiques volatils) doivent être enregistrés à chaque temps de prélèvement. Les taux de minéralisation doivent être enregistrés. Les résidus (liés) non extractibles dans le sédiment doivent être notés à chaque temps de prélèvement.

([1]) Dans le cas où les produits de transformation anaérobie peuvent se réoxyder très rapidement, les conditions anaérobies doivent être maintenues pendant l'échantillonnage et l'analyse.

▼B

2. **DONNÉES**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Le bilan massique total ou la récupération (voir le point 1.7.1) de la radioactivité ajoutée doit être calculé à chaque temps de prélèvement. Les résultats doivent être transcrits en pourcentage de radioactivité ajoutée. La répartition de la radioactivité entre l'eau et le sédiment doit être transcrite sous la forme de concentration et de pourcentage, à chaque temps de prélèvement.

La demi-vie, les valeurs DT_{50} et, le cas échéant, DT_{75} et DT_{90} de la substance d'essai doivent être calculées avec leurs limites de confiance (voir le point 1.7.3). Différents outils d'évaluation permettent d'obtenir des informations sur le taux de dégradation de la substance d'essai dans l'eau et le sédiment. Il est possible d'appliquer des cinétiques du pseudo premier ordre, des techniques d'interpolation empiriques utilisant des solutions graphiques ou numériques ou d'autres méthodes d'évaluation utilisant par exemple des modèles à un ou plusieurs compartiments. On trouvera plus de détails dans la littérature spécialisée (35) (36) (37).

Toutes les méthodes ont leurs avantages et leurs inconvénients et leur complexité varie considérablement. L'hypothèse d'une cinétique du premier ordre peut être une simplification trop poussée des processus de dégradation et de répartition, mais cette hypothèse, lorsque c'est possible, donne un terme (la constante de vitesse ou la demi-vie) facilement compréhensible et très utile en modélisation par simulation et pour calculer les concentrations prévisibles dans l'environnement. Les méthodes empiriques ou les transformations linéaires peuvent produire une meilleure interpolation entre les courbes et les données et permettre ainsi une meilleure estimation des demi-vies, des valeurs DT_{50} et, le cas échéant, DT_{75} et DT_{90}. L'utilisation des constantes dérivées est toutefois limitée. Les modèles à compartiments servent à établir des constantes utiles pour l'évaluation des risques qui décrivent la vitesse de dégradation dans les différents compartiments et la répartition de la substance chimique. Ils doivent également être utilisés pour estimer les constantes de vitesse de formation et de dégradation des principaux produits de transformation. Dans tous les cas, la méthode choisie doit être justifiée et l'expérimentateur doit démontrer graphiquement et/ou statistiquement la qualité de l'ajustement.

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport doit comprendre les informations suivantes:

Substance d'essai:

— nom courant, nom chimique, numéro de fichier CAS, formule structurale (indiquant la position du marquage lorsqu'on utilise un produit radiomarqué) et propriétés physico-chimiques pertinentes,

— pureté (impuretés) de la substance d'essai,

— pureté radiochimique de la substance marquée et activité molaire (s'il y a lieu).

▼B

Substances de référence:

— nom et structure chimique des substances de référence utilisées pour caractériser et/ou identifier les produits de transformation.

Sédiments et eaux d'essai:

— localisation et description du (ou des) site(s) de prélèvement des sédiments aquatiques avec, si possible, l'historique de la contamination,

— toute information relative au prélèvement, au stockage (s'il y a lieu) et à l'acclimatation des systèmes eau-sédiment,

— caractéristiques des échantillons eau-sédiment telles qu'indiquées dans le tableau du point 1.8.2.2.

Conditions de l'essai:

— système d'essai utilisé (circulation continue, biomètre, mode de ventilation, méthode de remuage, volume d'eau, masse sédimentaire, épaisseur de la couche d'eau et de la couche de sédiment, dimension des récipients d'essai, etc.),

— application de la substance d'essai au système: concentration utilisée, nombre de réplicats et de témoins, mode d'application de la substance d'essai (usage éventuel de solvant), etc.,

— température d'incubation,

— temps de prélèvement,

— méthodes d'extraction, rendements et limites de détection des méthodes analytiques,

— méthodes de caractérisation/identification des produits de transformation,

— modification du protocole d'essai ou des conditions de l'essai pendant l'étude.

Résultats:

— données brutes des analyses représentatives (toutes les données brutes doivent être conservées dans les archives BPL),

— reproductibilité et sensibilité des méthodes analytiques utilisées,

— taux de récupération (les % acceptables pour valider une étude sont présentés au point 1.7.1),

— tableaux des résultats exprimés en % de la dose appliquée et en $mg.kg^{-1}$ dans l'eau, le sédiment et le système total (% uniquement) de la substance d'essai et, s'il y a lieu, des produits de transformation et de la radioactivité non extractible,

— bilan massique pendant la durée et à la fin des expériences,

— représentation graphique de la transformation dans les fractions eau/sédiment et dans le système total (y compris la minéralisation),

— taux de minéralisation,

▼B

— durée de demi-vie, DT_{50} et, le cas échéant, valeurs DT_{75} et DT_{90} de la substance d'essai et, s'il y a lieu, des principaux produits de transformation comprenant les limites de confiance dans l'eau, le sédiment et dans le système total,

— une évaluation de la cinétique de transformation de la substance d'essai et, le cas échéant, des principaux produits de transformation,

— voie de transformation proposée, le cas échéant,

— discussion des résultats.

4. **RÉFÉRENCES**

(1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment System. Germany.

(2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

(3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water Systems. Ref No SC 9046. United Kingdom.

(4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) — Anaerobic and aerobic. Canada. p. 35-37.

(5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

(6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

(7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality — Sampling — Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

(9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

(10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

(11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, p. 945-956 (IUPAC 1984).

(12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

(13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

(14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988). Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem.BCPC — Pests and Diseases, 3B-4, p. 149-158.

▼B

(15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.

(16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, p. 631-637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C-labelled model surfactants. Water Research 21, p. 661-667.

(18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

(19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17^{th} edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

(20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

(21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, p. 1038- 1039.

(22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in fresh water mesocosms. From the Workshop «A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests», 3-4 July 1991.

(23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

(24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, p. 2858-2868.

(25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, p. 329-338.

(26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, p. 197-203.

(27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen, (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), p. 13-21.

(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, p. 850-857.

(30) Birch, R.R., Biver, C, Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550.

(31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, p. 1499-1509.

▼B

(32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, p. 3597-3603.

(33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

(34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contain. Toxicol. 58, p. 961-968.

(35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 39, p. 187-203.

(36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 33, p. 47-60.

(37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pestici- des in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference — Pest and Diseases, p. 1349- 1354.

▼B

Annexe 1

INFORMATIONS SUR LES SYSTÈMES D'ESSAI AÉROBIES ET ANAÉROBIES

Système d'essai aérobie

Le système d'essai aérobie décrit dans la présente méthode d'essai se compose d'une couche d'eau aérobie (généralement la concentration d'oxygène varie entre 7 et 10 $mg.1^{-1}$) et une couche de sédiment, aérobie à la surface et anaérobie sous la surface [généralement, le potentiel redox moyen (E_h) dans la zone anaérobie du sédiment est situé entre –80 et –190 mV]. On fait passer de l'air humide à la surface de l'eau dans chaque unité d'incubation afin de maintenir suffisamment d'oxygène dans l'espace libre.

Système d'essai anaérobie

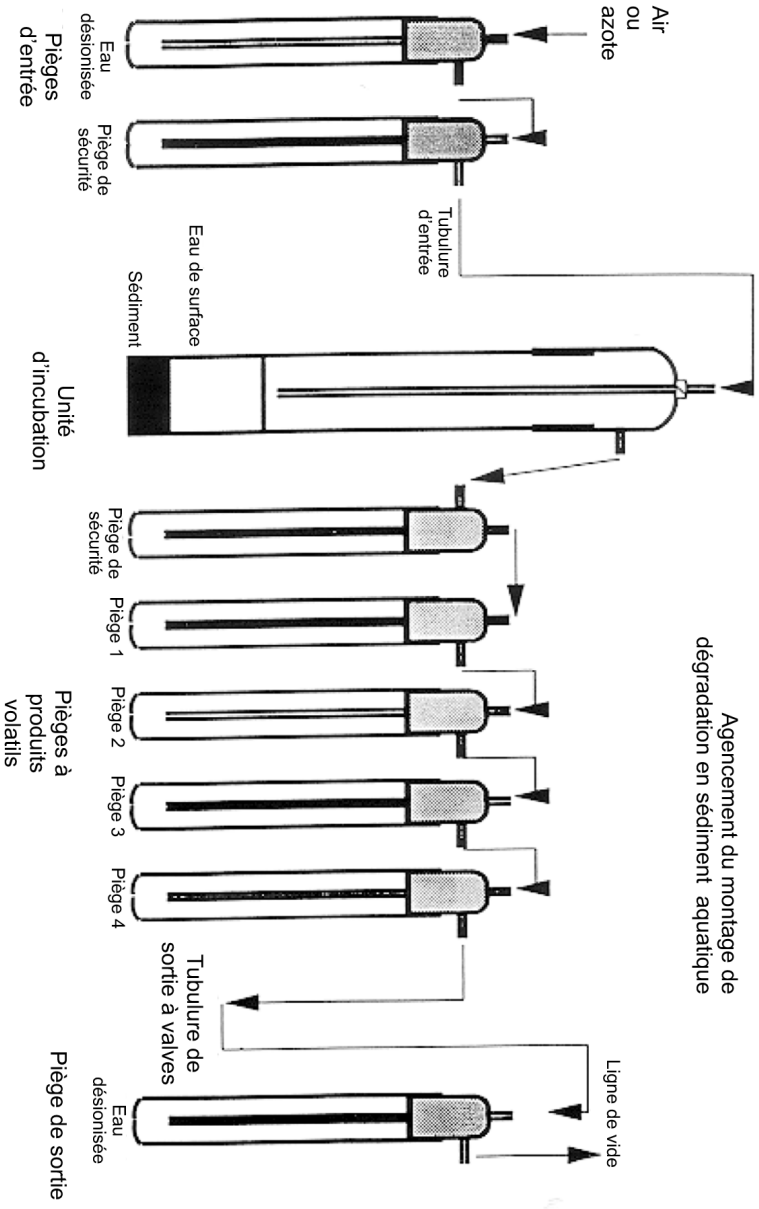
Dans le système d'essai anaérobie, la méthode d'essai est pratiquement la même que celle du système aérobie, à l'exception que l'on fait passer de l'azote humide à la surface de l'eau dans chaque unité d'incubation afin de maintenir un espace libre d'azote. Le sédiment et l'eau sont considérés comme anaérobies lorsque le potentiel redox (E_h) est inférieur à –100 mV.

Dans l'essai anaérobie, l'évaluation de la minéralisation comprend la mesure du dioxyde de carbone et du méthane dégagé.

▼B

Annexe 2

EXEMPLE D'APPAREIL À CIRCULATION CONTINUE

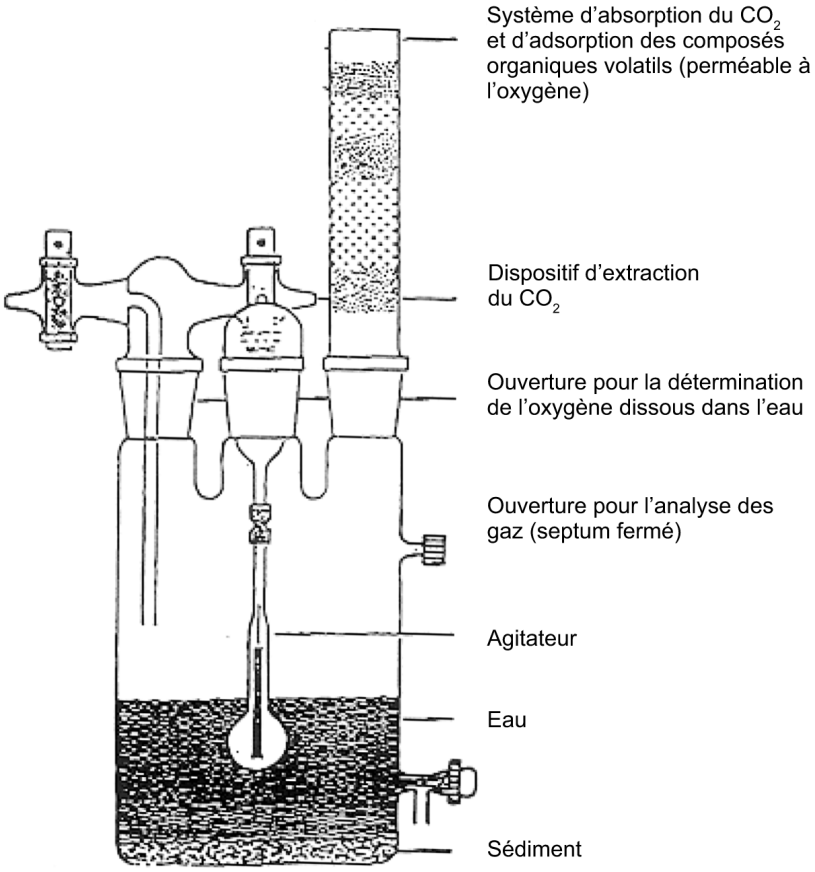


Piège de sécurité, vide
Piège 1:
éthylène glycol pour piéger les produits volatils organiques
Piège 2:
acide sulfurique 0,1 M pour piéger les produits volatils alcalins
Pièges 3 & 4:
hydroxyde de sodium 2 M pour piéger le CO_2 et les autres produits volatils acides

▼B

Annexe 3

EXEMPLE DE BIOMÈTRE



▼B

Annexe 4

EXEMPLE DE CALCUL DE LA DOSE À APPLIQUER AUX RÉCIPIENTS D'ESSAI

Diamètre interne du cylindre:	= 8 cm
Profondeur de la colonne d'eau excluant le sédiment:	= 12 cm
Surface: $3{,}142 \times 4^2$	= 50,3 cm^2
Taux d'application: 500 g de substance d'essai/ha correspondant à 5 µg/cm^2	
Total en µg: $5 \times 50{,}3$	= 251,5 µg
Ajuster la quantité par rapport à la quantité correspondant à une profondeur de 100 cm: $12 \times 251{,}5 \div 100$	= 30,18 µg
Volume de la colonne d'eau: $50{,}3 \times 12$	= 603 ml
Concentration dans l'eau: $30{,}18 \div 603$	= 0,050 µg/ml ou 50 µg/l

▼M1

C.25. MINÉRALISATION AÉROBIE DANS LES EAUX SUPERFICIELLES — ESSAI DE SIMULATION DE LA BIODÉGRADATION

1. MÉTHODE

Cette méthode est équivalente à la ligne directrice TG 309 (2004) de l'OCDE (1).

1.1. INTRODUCTION

Cet essai est destiné à mesurer la biodégradation en fonction du temps d'une substance d'essai présente en faible concentration dans une eau naturelle aérobie et à quantifier les observations sous la forme d'expressions cinétiques. Cet essai de simulation, réalisé en laboratoire avec des lots de flacons agités, sert à déterminer les vitesses de biodégradation aérobie de substances organiques dans des échantillons d'eaux naturelles de surface (douces, saumâtres ou marines). Il s'appuie sur la norme ISO/DIS 14592-1 (2) et reprend également des éléments des méthodes d'essai C.23 et C.24 (3)(4). Si l'essai dure longtemps, le procédé en lots peut être remplacé par un processus semi-continu, afin de prévenir la détérioration du microcosme expérimental. L'essai de simulation vise principalement à déterminer la minéralisation de la substance d'essai dans les eaux de surface, minéralisation qui est à la base de l'expression cinétique de la dégradation. Néanmoins, l'essai permet aussi, si on le souhaite, d'obtenir des renseignements sur la dégradation primaire et la formation des principaux produits de transformation. L'identification des produits de transformation et, si possible, la quantification de leurs concentrations, sont particulièrement importantes pour les substances qui se minéralisent très lentement (par exemple, dont la demi-vie du ^{14}C résiduel total dépasse soixante jours). L'identification et la quantification des principaux produits de transformation réclament normalement des concentrations plus élevées de la substance d'essai (par exemple, > 100 μg/l), en raison des limites analytiques.

Dans cet essai, on entend par faible concentration (par exemple, inférieure à 1 μg/l et jusqu'à 100 μg/l), une concentration suffisamment faible pour que la cinétique de biodégradation obtenue au cours de l'essai reflète les cinétiques que l'on s'attend à trouver dans l«environnement. Comparée à la masse totale des substrats carbonés biodégradables présents dans l'eau naturelle utilisée pour l»essai, la substance d'essai en faible concentration servira de substrat secondaire. Cela implique que la cinétique de biodégradation attendue soit de premier ordre (cinétique de «non-croissance») et que la substance d'essai puisse être dégradée par «cométabolisme». Une cinétique de premier ordre signifie que la vitesse de dégradation (mg/l/jour) est proportionnelle à la concentration du substrat qui diminue au cours du temps. Avec une véritable cinétique de premier ordre, la constante spécifique de la vitesse de dégradation, k, est indépendante du temps et de la concentration. Autrement dit, k ne varie pas sensiblement au cours d'une expérience et ne se modifie pas avec l'augmentation de la concentration entre les expériences. Par définition, la constante spécifique de la vitesse de dégradation est égale au changement relatif de concentration par unité de temps: $k = (1/C) . (dC/dt)$. Bien qu'il faille normalement s'attendre à une cinétique de premier ordre dans les conditions prescrites, il se peut que d'autres cinétiques soient plus appropriées dans certaines circonstances. Des écarts par rapport à la cinétique de premier ordre peuvent s'observer si, par exemple, un phénomène de transfert de masse, tel que la vitesse de diffusion, plutôt que la vitesse de réaction biologique, freine la biotransformation. Cependant, les résultats peuvent presque toujours être décrits par une cinétique de pseudo-premier ordre acceptant une constante de vitesse dépendante de la concentration.

▼M1

Avant d'entamer l'essai, il faudrait disposer d'informations sur la biodégradabilité de la substance d'essai aux concentrations supérieures (tirées, par exemple, d'essais préliminaires standard) et de données sur la dégradabilité abiotique, les produits de transformation et les propriétés physico-chimiques pertinentes, afin de mieux planifier l'essai et de faciliter l'interprétation des résultats. L'utilisation de substances d'essai marquées au ^{14}C et la détermination de la répartition du ^{14}C entre les phases à la fin de l'essai permettent de déterminer la biodégradabilité finale. Si on utilise une substance d'essai non marquée, la biodégradation finale ne peut être estimée que si une concentration supérieure est mise à l'essai et si tous les principaux produits de transformation sont connus.

1.2. DÉFINITIONS

Biodégradation primaire: transformation structurelle d'une substance chimique par des microorganismes, débouchant sur la perte de l'identité chimique.

Biodégradation fonctionnelle: transformation structurelle d'une substance chimique par des microorganismes, entraînant la perte d'une propriété spécifique.

Biodégradation aérobie finale: décomposition d'une substance chimique par des microorganismes, en présence d'oxygène, en dioxyde de carbone, eau et sels minéraux des autres éléments présents (minéralisation) et production d'une nouvelle biomasse et de produits organiques par synthèse biomicrobienne.

Minéralisation: décomposition d'une substance chimique ou de matières organiques par des microorganismes, en présence d'oxygène, en dioxyde de carbone, eau et sels minéraux des autres éléments présents.

Phase de latence: période comprise entre le début de l'essai et le moment où le degré de biodégradation d'une substance chimique ou de la matière organique atteint une valeur détectable (par exemple, 10 % de la biodégradation théorique maximale, ou moins, selon la précision de la technique de mesure) et durant laquelle les microorganismes dégradants s'adaptent.

Degré maximal de biodégradation: degré de biodégradation d'une substance chimique ou de la matière organique, au cours d'un essai, enregistré en pourcentage, au delà duquel la biodégradation ne se produit plus durant l'essai.

Substrat primaire: ensemble de sources de carbone naturel et d'énergie grâce auxquelles la biomasse microbienne croît et se maintient.

Substrat secondaire: élément du substrat présent à une concentration si faible que sa dégradation ne fournit que des quantités négligeables de carbone et d'énergie aux microorganismes compétents, en comparaison avec l'apport de carbone et d'énergie que les microorganismes tirent de la dégradation des principaux composés du substrat (substrats primaires).

Constante de vitesse de dégradation: constante de vitesse correspondant à une cinétique de premier ordre ou de pseudo-premier ordre, k ($jour^{-1}$), indiquant la vitesse des processus de dégradation. Dans un essai en lots, k est estimé à partir de la première partie de la courbe de dégradation, débutant juste après la fin de la phase de latence.

▼M1

Demi-vie, $t_{1/2}$ (jour): caractérise la vitesse d'une réaction de premier ordre; c'est le laps de temps durant lequel la concentration diminue d'un facteur 2. La relation entre la demi-vie et la constante de vitesse de dégradation est régie par l'équation: $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Demi-temps de dégradation, TD_{50} (jour): quantifie le résultat des essais de biodégradation; c'est le laps de temps, incluant la phase de latence, nécessaire pour atteindre 50 % de biodégradation.

Seuil de détection et seuil de quantification: le seuil de détection est la concentration d'une substance en dessous de laquelle il n'est plus possible de distinguer l'identité de la substance des artéfacts de la technique d'analyse. Le seuil de quantification est la concentration d'une substance en dessous de laquelle la concentration ne peut être déterminée avec une précision acceptable.

Carbone organique dissous (COD): fraction du carbone organique présent dans un échantillon d'eau qui ne peut être extraite par une technique de séparation des phases définie, par exemple par centrifugation à 40 000 ms^{-2} durant 15 minutes ou par filtration sur une membrane dont les pores mesurent entre 0,20 et 0,45 µm de diamètre.

Activité totale du ^{14}C organique (AOT): activité totale du ^{14}C associé au carbone organique.

Activité du ^{14}C organique dissous (AOD): activité totale du ^{14}C associé au carbone organique dissous.

Activité du ^{14}C organique particulaire (AOP): activité totale du ^{14}C associé au carbone organique particulaire.

1.3. APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

Cet essai de simulation s'applique aux substances organiques non volatiles ou légèrement volatiles testées à de faibles concentrations. Si l'on utilise des flacons ouverts à l'atmosphère (par exemple, fermés par des tampons d'ouate), les substances dont les constantes de Henry sont inférieures à environ 1 $Pa.m^3/mol$ (approximativement $10^{-5} atm.m^3/mol$) peuvent être considérées comme non volatiles en pratique. En utilisant des flacons fermés pourvus d'un espace libre au-dessus du liquide, il est possible de mettre à l'essai des substances légèrement volatiles (avec des constantes de Henry < 100 $Pa.m^3/mol$ ou < 10^{-3} $atm.m^3/mol$) sans que le système expérimental ne fuie. Des pertes de substances marquées au ^{14}C peuvent se produire si les précautions requises ne sont pas prises, lors de l'extraction du CO_2. Dans ces situations, il peut être nécessaire de piéger le CO_2 dans un absorbeur interne renfermant un produit alcalin ou d'utiliser un dispositif externe d'absorption du CO_2 (détermination directe du $^{14}CO_2$; voir annexe 3). Pour la détermination de la cinétique de biodégradation, les concentrations de la substance d'essai doivent être inférieures à la solubilité de cette dernière dans l'eau. Remarquons, toutefois, que les valeurs d'hydrosolubilité mentionnées dans les publications peuvent dépasser de beaucoup la solubilité de la substance d'essai dans les eaux naturelles. Il est possible, le cas échéant, de déterminer la solubilité des substances d'essai particulièrement peu solubles dans l'eau en utilisant les eaux naturelles mises à l'essai.

La méthode permet de simuler la biodégradation dans des eaux superficielles exemptes de particules grossières («essai pélagique») ou dans des eaux superficielles troubles, comme celles qui peuvent se trouver à proximité d'une interface eau-sédiments («essai en suspension de sédiments»).

▼M1

1.4. PRINCIPE DE L'ESSAI

On réalise l'essai par lots, en incubant la substance d'essai dans l'eau superficielle uniquement («essai pélagique»), ou dans l'eau superficielle enrichie d'une suspension de solides/sédiments de 0,01 à 1 g/l de poids sec («essai en suspension de sédiments») pour simuler un plan d'eau contenant des solides en suspension ou des sédiments resuspendus. La plupart des eaux superficielles renferment des solides/sédiments en suspension à une concentration correspondant aux valeurs inférieures de cette gamme. Les flacons d'essai sont incubés dans l'obscurité à la température de l'environnement étudié, en aérobiose et sous agitation. Il faut utiliser au moins deux concentrations différentes de la substance d'essai pour déterminer la cinétique de dégradation. Les concentrations devraient être espacées d'un facteur de 5 à 10 et représenter la gamme de concentrations supposée régner dans l'environnement. La concentration maximale de la substance d'essai ne devrait pas excéder 100 µg/l, mais il est préférable d'appliquer des concentrations maximales inférieures à 10 µg/l pour s'assurer que la biodégradation obéit à une cinétique de premier ordre. La concentration la plus faible ne devrait pas dépasser 10 µg/l, mais il vaut mieux choisir une concentration minimale de 1 à 2 µg/l ou inférieure à 1 µg/l. En règle générale, une concentration aussi faible peut être correctement analysée en utilisant des substances marquées au ^{14}C vendues dans le commerce. Compte tenu des limites analytiques, il est souvent impossible de mesurer la concentration de la substance d'essai avec la précision requise si cette substance est appliquée à une concentration ≤ 100 µg/l (voir deuxième alinéa du paragraphe 1.7.2). Des concentrations plus élevées de la substance d'essai (>100 µg/l et quelquefois > 1 mg/l) peuvent être utilisées pour l'identification et la quantification des principaux produits de transformation, ou s'il n'existe pas de méthode d'analyse spécifique pourvue d'un seuil de détection bas. En testant des concentrations élevées de la substance d'essai, on risque de ne pas pouvoir utiliser les résultats pour estimer la constante de dégradation de premier ordre et la demi-vie, car la dégradation n'obéira probablement pas à une cinétique de premier ordre.

La dégradation est suivie, à des intervalles de temps appropriés, par la mesure du ^{14}C résiduel ou de la concentration résiduelle de la substance d'essai lorsqu'on utilise une méthode spécifique d'analyse chimique. Le marquage au ^{14}C de la partie la plus stable de la molécule permet de déterminer la minéralisation totale, tandis que le marquage d'une partie moins stable de la molécule, de même que le recours à une analyse spécifique, ne permettra d'évaluer que la biodégradation primaire. Néanmoins, la partie la plus stable n'inclut pas nécessairement le groupement fonctionnel pertinent de la molécule (qui peut lui conférer une propriété particulière, telle que la toxicité, la bioaccumulation, etc.). Si c'est le cas, il peut être utile d'utiliser une substance d'essai, marquée au ^{14}C, dans le groupement fonctionnel, afin de suivre l'élimination de la propriété particulière.

1.5. INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

Cet essai convient aussi bien aux substances radiomarquées qu'aux substances non marquées. Le marquage recommandé est celui au ^{14}C et devrait normalement s'effectuer sur la ou les parties les plus stables de la molécule (voir également paragraphe 1.4). Pour les substances renfermant plus d'un cycle aromatique, il est préférable de marquer un ou plusieurs atomes de carbone de chaque cycle. En outre, il est préférable de marquer au ^{14}C un ou plusieurs atomes de carbone situés de part et d'autre d'une liaison chimique facilement dégradable. La pureté chimique et/ou radiochimique de la substance d'essai devrait être supérieure à 95 %. En ce qui concerne les substances radiomarquées, une activité spécifique d'au moins quelque 50 µCi/mg (1,85 MBq) est préférable pour faciliter la mesure du ^{14}C dans les essais réalisés avec de faibles concentrations initiales. Les informations suivantes sur la substance d'essai devraient être connues:

▼**M1**

— solubilité dans l'eau [méthode A.6],

— solubilité dans un ou plusieurs solvants organiques (substances appliquées avec un solvant ou peu solubles dans l'eau),

— constante de dissociation (pKa) si la substance est sujette à la protonation ou à la déprotonation [ligne directrice TG 112 de l'OCDE] (5),

— pression de vapeur [méthode A.4] et constante de Henry,

— stabilité chimique dans l'eau et dans l'obscurité (hydrolyse) [méthode C.7].

Si des substances peu solubles dans l'eau sont mises à l'essai dans de l'eau de mer, il peut aussi être utile de connaître la constante de désalination (ou «constante de Setschenow») Ks, définie par l'expression suivante: $\log (S/S') = K^s . C_m$, où S et S' représentent respectivement la solubilité de la substance dans l'eau douce et dans l'eau de mer, et C_m la concentration molaire des sels.

Si l'essai est un «essai en suspension de sédiments», on devrait également disposer des informations suivantes:

— coefficient de partage n-octanol/eau [méthode A.8],

— coefficient d'adsorption [méthode C.18],

Parmi les autres renseignements utiles, citons:

— la concentration dans la nature, si elle est connue ou estimée,

— la toxicité de la substance d'essai pour les microorganismes [méthode C.11],

— la biodégradabilité immédiate et/ou intrinsèque [méthodes C.4 A-F, C.12, C.9, ligne directrice TG 302 de l'OCDE (5)],

— la biodégradabilité aérobie ou anaérobie dans le sol et les études de transformation sédiment/eau [méthodes C.23, C.24].

1.6. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Il convient d'utiliser une substance de référence qui, normalement, se dégrade facilement en aérobiose (aniline ou benzoate de sodium, par exemple). La dégradation de l'aniline et du benzoate de sodium prend généralement moins de deux semaines. L'emploi de substances de référence sert à vérifier que l'activité microbienne de l'eau d'essai se situe dans une certaine gamme, autrement dit, que l'eau renferme une flore microbienne active.

▼M1

1.7. CRITÈRES DE QUALITÉ

1.7.1. **Récupération**

Immédiatement après l'ajout de la substance d'essai, chaque concentration expérimentale initiale devrait être vérifiée par une mesure de l'activité du ^{14}C, ou par des analyses chimiques s'il s'agit de substances non marquées, dans au moins deux échantillons. Cette mesure nous renseigne sur l'applicabilité et la répétabilité de la méthode d'analyse et sur l'homogénéité de la répartition de la substance d'essai. Normalement, on utilise l'activité du ^{14}C initiale mesurée, équivalant à la concentration de la substance d'essai, dans les analyses ultérieures des résultats plutôt que la concentration nominale, ce qui compense les pertes par sorption et les erreurs de dosage. Pour les substances d'essai marquées au ^{14}C, le taux de récupération à la fin de l'expérience est fourni par le bilan massique (voir dernier alinéa du paragraphe 1.8.9.4). Idéalement, le bilan massique radiomarqué devrait se situer entre 90 % et 110 %, tandis que la méthode d'analyse devrait donner un taux de récupération initial compris entre 70 % et 110 % pour les substances d'essai non marquées. Ces intervalles sont donnés à titre indicatif et ne devraient pas servir de critères d'acceptation pour l'essai. On peut, si on le souhaite, déterminer l'exactitude de la méthode d'analyse pour la substance d'essai à une concentration inférieure à la concentration initiale et pour les principaux produits de transformation.

1.7.2. **Répétabilité et sensibilité de la méthode analytique**

La répétabilité de la méthode analytique (notamment l'efficacité de l'extraction initiale) pour quantifier la substance d'essai, et les produits de transformation le cas échéant, devrait être vérifiée par cinq analyses identiques d'extraits de l'eau superficielle.

Le seuil de détection de la méthode analytique pour la substance d'essai et les produits de transformation devrait, si possible, atteindre au moins 1 % de la quantité introduite initialement dans le système expérimental. La limite de quantification devrait être inférieure ou égale à 10 % de la concentration appliquée. Les analyses chimiques de nombreuses substances organiques et de leurs produits de transformation exigent souvent des concentrations relativement élevées de la substance d'essai, à savoir > 100 µg/l.

1.8. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.8.1. **Matériel**

L'essai peut être effectué dans des flacons cylindriques ou coniques d'une capacité adéquate (0,5 ou 1,0 litre, par exemple), fermés par des bouchons en silicone ou en caoutchouc, ou dans des bouteilles à sérum munies de couvercles étanches au CO_2 (avec des bouchons cloisonnés (septa) en caoutchouc butylique, par exemple). Une autre possibilité consiste à pratiquer l'essai avec plusieurs flacons et à prélever des flacons entiers (au moins deux identiques) à chaque intervalle de prélèvement (voir dernier alinéa du paragraphe 1.8.9.1). Pour les substances d'essai non volatiles et non radiomarquées, il n'est pas nécessaire d'employer des bouchons ou des couvercles étanches aux gaz; des tampons d'ouate empêchant la contamination par l'air suffisent (voir deuxième alinéa du paragraphe 1.8.9.1). Les substances légèrement volatiles devraient être testées dans un système de type biomètre fournissant une agitation douce à la surface de l'eau. Si l'on veut être sûr d'empêcher toute contamination bactérienne, on peut éventuellement stériliser les récipients en les chauffant ou en les autoclavant avant l'emploi. En outre, les instruments courants de laboratoire suivants sont nécessaires:

— une table tournante ou des agitateurs magnétiques pour agiter en continu les flacons expérimentaux,

▼**M1**

— une centrifugeuse,

— un pH-mètre,

— un turbidimètre pour les mesures néphélométriques de la turbidité,

— un four ou un four à micro-ondes pour les déterminations pondérales,

— un appareil de filtration à membrane,

— un autoclave ou un four pour stériliser la verrerie,

— des instruments permettant de manipuler les substances marquées au ^{14}C,

— un appareil permettant de quantifier l'activité du ^{14}C dans des échantillons de solutions piégeant le CO_2 et, si nécessaire, dans des échantillons de sédiment,

— des instruments analytiques pour doser la substance d'essai (et de référence) si l'on pratique une analyse chimique spécifique (chromatographie en phase gazeuse, en phase liquide à haute pression, par exemple).

1.8.2. **Solutions mères de la substance d'essai**

Les solutions mères de la substance d'essai et de la substance de référence sont préparées avec de l'eau désionisée (voir premier alinéa du paragraphe 1.8.7). L'eau désionisée devrait être exempte de substances susceptibles d'être toxiques pour les microorganismes et la teneur en carbone organique dissous (COD) ne devrait pas dépasser 1 mg/l (6).

1.8.3. **Prélèvement et transport de l'eau de surface**

Quelle que soit la situation, le site de prélèvement de l'eau superficielle sera choisi en fonction de la finalité de l'essai. Il faut se renseigner sur le déversement antérieur d'éventuels effluents agricoles, industriels ou domestiques et en tenir compte dans la sélection du site. S'il s'avère qu'un milieu aquatique a été contaminé par la substance d'essai ou l'un de ses analogues de structure au cours des quatre dernières années, l'eau d'essai ne doit pas y être prélevée, à moins que l'expérimentateur n'étudie précisément la vitesse de dégradation dans des sites précédemment exposés. Le pH et la température de l'eau sont à mesurer sur le lieu de prélèvement. On notera également la profondeur de prélèvement et l'aspect de l'échantillon d'eau (couleur et turbidité, par exemple) (voir paragraphe 3). Il faut mesurer la concentration d'oxygène et/ou le potentiel redox dans l'eau et dans la couche superficielle du sédiment afin de démontrer l'aérobiose, sauf si cette condition est patente à en juger par l'apparence et une connaissance préalable du site. L'eau superficielle doit être transportée dans un récipient très bien nettoyé. Durant le transport, la température de l'échantillon n'excédera guère la température appliquée dans l'essai. Le refroidissement à 4 °C est recommandé si le transport dure plus de deux ou trois heures. Il ne faut pas congeler l'échantillon d'eau.

▼M1

1.8.4. **Stockage et préparation de l'eau superficielle**

Il est préférable de commencer l'essai au plus tard le lendemain du prélèvement de l'échantillon. Le cas échéant, le stockage de l'eau sera réduit au minimum et n'excédera en aucun cas quatre semaines. L'échantillon d'eau devrait être conservé à 4 °C, sous aération, jusqu'à utilisation. Les particules grossières devront être éliminées de l'échantillon d'eau avant son utilisation, par exemple par filtration à travers une toile de nylon dont les mailles mesurent quelque 100 μm ou un papier filtre grossier, ou par sédimentation.

1.8.5. **Préparation de l'eau additionnée de sédiment (facultatif)**

Pour l'essai en suspension de sédiment, on ajoute le sédiment superficiel aux flacons contenant l'eau naturelle (filtrée pour être exempte de particules grossières, comme décrit au paragraphe 1.8.4), afin d'obtenir une suspension; la concentration des solides suspendus devrait être comprise entre 0,01 et 1 g/l. Le sédiment superficiel devrait provenir du même site que l'échantillon d'eau. Suivant les particularités du milieu aquatique, le sédiment superficiel peut se caractériser soit par une teneur élevée en carbone organique (2,5-7,5 %) et une texture fine, soit par une faible teneur en carbone organique (0,5-2,5 %) et une texture grossière (3). Le sédiment superficiel peut être préparé de la façon suivante: extraire plusieurs carottes de sédiment au moyen de tubes en plastique transparent, découper les tranches contenant les couches supérieures aérobies (à une profondeur maximale de 5 mm à partir de la surface) immédiatement après le prélèvement, et les réunir. L'échantillon de sédiment ainsi obtenu devrait être transporté dans un récipient muni d'un vaste espace libre au-dessus du contenu, de façon à maintenir le sédiment en aérobiose (refroidir à 4 °C si le transport dure plus de deux à trois heures). L'échantillon de sédiment devrait être suspendu dans l'eau d'essai dans une proportion de 1/10 et conservé à 4 °C sous aération jusqu'à son utilisation. Le cas échéant, le stockage du sédiment sera réduit au minimum et n'excédera en aucun cas quatre semaines.

1.8.6. **Procédé semi-continu (facultatif)**

Une incubation prolongée (plusieurs mois) peut s'avérer nécessaire lorsqu'il s'écoule une longue période de latence avant qu'il ne soit possible de mesurer une dégradation sensible de la substance d'essai. Si des expérimentations antérieures ont révélé que tel était le cas de la substance d'essai, l'essai peut débuter par un procédé semi-continu qui permet le renouvellement périodique d'une partie de l'eau ou de la suspension d'essai (voir annexe 2). Par ailleurs, l'essai normal par lots peut être converti en essai semi-continu si aucune dégradation de la substance d'essai n'est observée après une soixantaine de jours d'essai (voir deuxième alinéa du paragraphe 1.8.8.3).

1.8.7. **Ajout de la substance d'essai (ou de référence)**

Pour les substances dont l'hydrosolubilité est élevée (> 1 mg/l) et la volatilité faible (constante de Henry < 1 $Pa.m^3/mol$ ou < 10^{-5} $atm.m^3/mol$), la solution mère peut être préparée dans de l'eau désionisée (voir paragraphe 1.8.2): on verse le volume nécessaire de solution mère dans les récipients expérimentaux pour obtenir la concentration voulue. Le volume de solution mère ajouté ne devrait pas excéder le minimum pratique (< 10 % du volume de liquide final, si possible). Un autre procédé consiste à dissoudre la substance d'essai dans un plus grand volume d'eau d'essai, au lieu de recourir à des solvants organiques, par exemple.

▼M1

S'il est impossible de procéder autrement, les solutions mères de substances non volatiles et peu solubles dans l'eau sont préparées à l'aide d'un solvant organique volatil, mais la quantité de solvant ajoutée au système expérimental ne doit pas dépasser 1 % v/v, ni nuire à l'activité microbienne. Le solvant ne devrait pas affecter la stabilité de la substance d'essai dans l'eau. On enlève le solvant jusqu'à ce qu'il n'en subsiste qu'une quantité extrêmement faible, de façon à ce qu'il n'augmente pas sensiblement la teneur en COD de l'eau ou de la suspension d'essai. Ce point est à vérifier par une analyse de la substance d'essai ou, si possible, du COD (6). On veillera à limiter la quantité de solvant transférée au strict minimum pour dissoudre la quantité de substance d'essai dans le volume final d'eau d'essai. D'autres techniques permettant d'introduire la substance d'essai dans les récipients expérimentaux peuvent être utilisées, comme cela a été décrit dans les références (7) et (8). Lorsqu'on utilise un solvant organique pour appliquer la substance d'essai, les témoins au solvant contenant l'eau d'essai (sans aucun ajout) et l'eau d'essai additionnée de la substance de référence devraient être traités de la même manière que les récipients expérimentaux renfermant la substance d'essai véhiculée par le solvant. Les témoins au solvant servent à mettre en évidence d'éventuels effets nocifs de ce dernier pour la flore microbienne, d'après la dégradation de la substance de référence.

1.8.8. **Conditions expérimentales**

1.8.8.1. *Température*

L'incubation devrait avoir lieu dans l'obscurité (de préférence) ou sous une lumière diffuse, à une température réglée (± 2 °C) qui peut être la température relevée sur le site ou une température standard de 20-25 °C. La température du site peut être la température de l'échantillon au moment du prélèvement ou une température moyenne du site de prélèvement.

1.8.8.2. *Agitation*

Il convient de fournir une agitation continue, afin de maintenir les particules et les microorganismes en suspension. L'agitation facilite également le transfert d'oxygène de l'espace libre situé au-dessus du liquide vers le liquide, ce qui permet de maintenir correctement l'aérobiose. Les flacons sont placés sur une table tournante (agitation d'environ 100 rpm) ou munis d'agitateurs magnétiques. L'agitation doit être continue, mais aussi douce que possible, de façon à maintenir l'homogénéité de la suspension.

1.8.8.3. *Durée de l'essai*

La durée de l'essai ne devrait normalement pas dépasser 60 jours, à moins que l'on n'ait opté pour le procédé semi-continu avec renouvellement périodique de la suspension expérimentale (voir paragraphe 1.8.6 et annexe 2). Toutefois, l'essai par lots peut-être prolongé jusqu'à 90 jours au maximum si la dégradation de la substance d'essai a débuté au cours des 60 premiers jours. La dégradation est contrôlée, à intervalles appropriés, par la détermination de l'activité du ^{14}C résiduel ou du $^{14}CO_2$ dégagé (voir paragraphe 1.8.9.4) et/ou par analyse chimique (paragraphe 1.8.9.5). Le temps d'incubation doit être suffisamment long pour permettre d'évaluer le processus de dégradation. Il serait préférable que la dégradation excède 50 %; pour les substances lentement dégradables, le degré de dégradation doit être suffisant (normalement supérieur à 20 %) pour permettre l'estimation d'une constante cinétique de la vitesse de dégradation.

▼M1

Le pH et la concentration d'oxygène sont à mesurer périodiquement dans le système expérimental, à moins que l'expérience acquise par des essais identiques menés sur des échantillons d'eau et de sédiments prélevés sur le même site ne rende ces mesures superflues. Dans certaines conditions, le métabolisme de substrats primaires présents à des concentrations bien plus élevées dans l'eau ou le sédiment pourrait engendrer un dégagement de CO_2 et une diminution d'oxygène tels qu'ils modifieraient sensiblement les conditions expérimentales durant l'essai.

1.8.9. **Mode opératoire**

1.8.9.1. *Préparation des flacons destinés à l'essai pélagique*

On transfère un volume approprié d'au moins quelque 100 ml d'eau d'essai dans les flacons expérimentaux, de façon à les remplir environ au tiers. Si on utilise plusieurs flacons (de façon à prélever des flacons entiers à chaque moment de prélèvement), le volume approprié d'eau d'essai s'élève aussi à environ 100 ml, les petits volumes risquant d'influencer la longueur de la phase de latence. La substance d'essai est ajoutée à partir d'une solution mère, comme décrit aux paragraphes 1.8.2 et 1.8.7. Il faudrait utiliser au moins deux concentrations de la substance d'essai, espacées d'un facteur de 5 à 10, pour déterminer la cinétique de dégradation et calculer la constante cinétique de la vitesse de dégradation. Les deux concentrations choisies devraient être inférieures à 100 µg/l et de préférence comprises dans l'intervalle 1-10 µg/l.

Les flacons sont fermés avec des bouchons ou des couvercles étanches à l'air et au CO_2. Pour les substances d'essai non volatiles et non marquées au ^{14}C, des tampons d'ouate empêchant la contamination par l'air suffisent (voir paragraphe 1.8.1), à condition que les principaux produits de dégradation soient notoirement non volatils et que l'on procède à une détermination indirecte du CO_2 (voir annexe 3).

Les flacons sont incubés à la température choisie (voir paragraphe 1.8.8.1). Les échantillons destinés à l'analyse chimique ou à la détermination du ^{14}C sont prélevés au début de l'essai (avant le début de la biodégradation; voir paragraphe 1.7.1), puis à une fréquence appropriée au cours de l'essai. Le prélèvement peut s'effectuer par l'extraction de sous-échantillons (aliquotes de 5 ml, par exemple) de chaque expérience identique ou par la collecte de flacons entiers à chaque moment de prélèvement. La minéralisation de la substance d'essai se détermine directement ou indirectement (voir annexe 3). Habituellement, il est nécessaire d'inclure au moins cinq points de prélèvement durant la phase de dégradation (après la fin de la phase de latence) pour estimer une constante de vitesse fiable, sauf si l'on peut justifier que trois points de prélèvement suffisent pour les substances rapidement dégradables. Les substances à dégradation lente se prêtent aisément à plus de mesures durant la phase de dégradation, si bien qu'il faut inclure plus de points pour l'estimation de k. Il est impossible de prescrire un calendrier fixe pour les prélèvements puisque la vitesse de biodégradation varie; on recommande toutefois d'effectuer un prélèvement par semaine si la dégradation est lente. Si la substance d'essai se dégrade rapidement, les prélèvements devraient avoir lieu une fois par jour durant les trois premiers jours, puis tous les deux ou trois jours. Dans certaines circonstances, notamment dans le cas de substances s'hydrolysant très rapidement, il pourra être nécessaire de pratiquer un prélèvement horaire. On recommande d'effectuer une étude préliminaire avant l'essai, afin de déterminer le rythme de prélèvement approprié. Si l'on doit conserver des échantillons en vue d'autres analyses spécifiques, il est préférable de prélever davantage d'échantillons et de sélectionner ensuite ceux à analyser à la fin de l'expérience suivant une logique d'ordre inverse, c'est-à-dire que les derniers échantillons seront analysés en premier (le deuxième alinéa du paragraphe 1.8.9.5 donne des conseils sur la façon de préserver la stabilité des échantillons durant le stockage).

▼**M1**

1.8.9.2. *Nombre de flacons et d'échantillons*

Préparer suffisamment de flacons expérimentaux de façon à disposer:

— de flacons d'essai: au moins deux flacons pour chaque concentration de la substance d'essai (de préférence au moins trois) ou une série de flacons d'essai pour chaque concentration si des flacons entiers sont prélevés à chaque moment de prélèvement (symbolisés par F_T),

— de flacons d'essai pour le calcul du bilan massique: au moins deux flacons pour chaque concentration expérimentale (symbolisés par F_M),

— de témoins sans substance d'essai: au moins un flacon ne contenant que l'eau d'essai (symbolisé par F_B),

— de témoins de référence: deux flacons contenant la substance de référence (aniline ou benzoate de sodium, par exemple, à 10 µg/l) (symbolisés par F_C). Le témoin de référence sert à confirmer l'existence d'une activité microbienne minimale. S'il y a lieu, une substance de référence radiomarquée peut être utilisée, y compris lorsque la dégradation de la substance d'essai est suivie par des analyses chimiques,

— de témoins stériles: un ou deux flacons contenant de l'eau d'essai stérilisée pour vérifier l'existence éventuelle d'une dégradation abiotique ou d'une autre élimination non biologique de la substance d'essai (symbolisés par F_S). L'activité biologique peut être supprimée par autoclavage (121 °C; 20 min) de l'eau d'essai ou par ajout d'un toxique [par exemple, azoture de sodium (NaN_3) à 10-20 g/l, chlorure de mercure ($HgCl_2$) à 100 mg/l ou formaline à 100 mg/l] ou par irradiation gamma. Si l'on utilise du $HgCl_2$, il faudra l'éliminer comme un déchet toxique. Il est difficile de stériliser une eau renfermant une grande quantité de sédiments ajoutés; dans ce cas, un autoclavage répété est recommandé (par exemple, trois fois). Il faut tenir compte du fait que les caractéristiques de sorption du sédiment peuvent être altérées par l'autoclavage,

— de témoins au solvant contenant l'eau d'essai ainsi que l'eau d'essai et la substance de référence: des flacons en double exemplaire contenant la même quantité de solvant, appliquée de la même façon que la substance d'essai. Ces témoins servent à détecter une éventuelle nocivité du solvant, d'après la dégradation de la substance de référence.

En concevant l'essai, l'expérimentateur doit apprécier l'importance relative de l'augmentation du nombre d'expériences identiques au regard de l'augmentation de la fréquence des prélèvements. Le nombre exact de flacons requis dépendra de la méthode employée pour mesurer la dégradation (voir troisième alinéa du paragraphe 1.8.9.1 et du paragraphe 1.8.9.4, ainsi que l'annexe 3).

▼**M1**

On prélève deux sous-échantillons (par exemple, des aliquotes de 5 ml) dans chaque flacon expérimental, à chaque moment de prélèvement. Si on utilise une série de flacons afin de prélever des flacons entiers, il faut sacrifier au moins deux flacons à chaque moment de prélèvement (voir premier alinéa du paragraphe 1.8.9.1).

1.8.9.3. *Préparation des flacons destinés à l'essai en suspension de sédiments (facultatif)*

On verse les volumes nécessaires d'eau d'essai et de sédiments, le cas échéant, dans les flacons expérimentaux (voir paragraphe 1.8.5). Les flacons destinés à l'essai en suspension de sédiments sont préparés de la même façon que les flacons pour l'essai pélagique (voir paragraphes 1.8.9.1 et 1.8.9.2). On utilise de préférence des bouteilles à sérum ou des flacons ayant la même forme. Les flacons fermés sont placés horizontalement sur un agitateur. Il va de soi que les flacons ouverts contenant les substances non volatiles, non marquées au ^{14}C, doivent être placés en position verticale; dans ce cas, il est recommandé d'utiliser des agitateurs magnétiques et des barres magnétiques enrobées de verre. Si nécessaire, on aère les bouteilles pour maintenir une aérobiose adéquate.

1.8.9.4. *Déterminations radiochimiques*

Le $^{14}CO_2$ dégagé se mesure directement et indirectement (voir annexe 3). Le $^{14}CO_2$ est mesuré indirectement d'après la différence entre l'activité initiale du ^{14}C dans l'eau d'essai ou la suspension et l'activité résiduelle totale au moment du prélèvement, mesurée après avoir acidifié l'échantillon à pH 2-3 et extrait le CO_2. Le carbone minéral est ainsi éliminé et l'activité résiduelle mesurée provient des composés organiques. Le $^{14}CO_2$ ne doit pas être déterminé indirectement s'il y a des composés volatils parmi les principaux produits de transformation qui se forment (voir annexe 3). Si possible, le dégagement de $^{14}CO_2$ est mesuré directement (voir annexe 3) à chaque moment de prélèvement dans au moins un flacon expérimental; ce mode opératoire permet de vérifier le bilan massique et le processus de biodégradation, mais il ne convient qu'aux essais réalisés avec des flacons fermés.

Si le $^{14}CO_2$ dégagé est mesuré directement au cours de l'essai, il convient de prévoir un plus grand nombre de flacons à cet effet au début de l'essai. La détermination directe du $^{14}CO_2$ est recommandée s'il y a des composés volatils parmi les principaux produits de transformation de la substance d'essai. À chaque point de mesure, les flacons expérimentaux supplémentaires sont acidifiés à pH 2-3 et le $^{14}CO_2$ est collecté dans un absorbeur interne ou externe (voir annexe 3).

On peut, si on le souhaite, déterminer les concentrations de la substance d'essai marquée au ^{14}C et des principaux produits de transformation par radiochromatographie (par exemple, chromatographie en couche mince, RAD-TLC) ou HPLC couplée à une détection radiochimique.

On peut aussi, si on le souhaite, déterminer la répartition entre les phases de la radioactivité restante (voir annexe 1), ainsi que de la substance d'essai résiduelle et des produits de transformation.

▼**M1**

À la fin de l'essai, le bilan massique devrait être établi par une mesure directe du $^{14}CO_2$, effectuée à l'aide de flacons expérimentaux distincts d'où aucun échantillon n'a été prélevé au cours de l'essai (voir annexe 3).

1.8.9.5. *Analyse chimique spécifique*

Si l'on dispose d'une méthode analytique spécifique sensible, la biodégradation primaire peut être évaluée par une mesure de la concentration résiduelle totale de la substance d'essai, plutôt que par des techniques de radiomarquage. Si l'on utilise une substance d'essai radiomarquée (pour mesurer la minéralisation totale), des analyses chimiques spécifiques peuvent être pratiquées en parallèle pour fournir des informations supplémentaires utiles et vérifier le procédé. Des analyses chimiques spécifiques peuvent aussi être utilisées pour mesurer les produits de transformation formés durant la dégradation de la substance d'essai, et cette procédure est recommandée pour les substances dont la demi-vie de minéralisation dépasse soixante jours. La concentration de la substance d'essai et des produits de transformation à chaque moment de prélèvement devrait être mesurée et rapportée (en termes de concentration et de pourcentage appliqué). En général, les produits de transformation détectés à ≥ 10 % de la concentration appliquée, à un quelconque moment de prélèvement, doivent être identifiés, à moins que le contraire ne se justifie. On envisagera aussi d'identifier les produits de transformation dont les concentrations s'accroissent continuellement au cours de l'étude, même si leur concentration n'atteint pas le seuil susmentionné, car cela pourrait être un signe de persistance. On envisagera d'analyser les produits de transformation présents dans les témoins stériles si une transformation abiotique rapide de la substance d'essai (par hydrolyse, par exemple) est jugée possible. La nécessité de quantifier et d'identifier les produits de transformation est à évaluer cas par cas et à justifier dans le rapport. Les techniques d'extraction faisant appel à un solvant organique doivent être appliquées selon les instructions données pour le procédé d'analyse respectif.

Tous les échantillons doivent être stockés à une température de 2 à 4 °C dans des récipients étanches à l'air si l'analyse est réalisée dans les vingt-quatre heures, ce qui est préférable. Si la période de stockage est plus longue, les échantillons doivent être congelés à – 18 °C ou conservés chimiquement. Il est déconseillé d'acidifier les échantillons pour les conserver, car l'acidification risque de les rendre instables. Si les échantillons ne sont pas analysés dans les vingt-quatre heures et sont conservés au-delà de ce délai, une étude de stabilité du stockage doit être effectuée pour démontrer la stabilité des produits chimiques en question à – 18 °C ou dans des conditions de conservation. Si la méthode d'analyse requiert une extraction au solvant ou une extraction de la phase solide, l'extraction doit être menée immédiatement après le prélèvement ou après le stockage de l'échantillon au réfrigérateur durant vingt-quatre heures au maximum.

Suivant la sensibilité de la méthode analytique, il pourra être nécessaire de prélever des échantillons d'un volume supérieur à celui indiqué au paragraphe 1.8.1. Il est facile de réaliser l'essai avec des volumes d'un litre contenus dans des flacons d'une capacité de 2 à 3 litres, ce qui permet de recueillir des échantillons d'environ 100 ml.

▼M1

2. **RÉSULTATS ET RAPPORT**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

2.1.1. **Représentation graphique des résultats**

Il convient d'arrondir les intervalles de prélèvement à un nombre d'heures entier (sauf si la substance se dégrade fortement en l'espace de quelques heures ou minutes), mais pas à un nombre de jours entier. On produit un tracé linéaire et un tracé semi-logarithmique des estimations de l'activité résiduelle de la substance d'essai (pour les substances marquées au ^{14}C) ou de la concentration résiduelle (pour les substances non marquées) en fonction du temps (voir figures 1a et 1b). S'il y a eu une dégradation, on compare les résultats des flacons F_T à ceux des flacons F_S. Si les moyennes des résultats des flacons contenant la substance d'essai (F_T) et des flacons stériles (F_S) s'écartent de moins de 10 %, on peut supposer que la dégradation observée est principalement abiotique. Si la dégradation mesurée dans les flacons F_S est inférieure, les résultats peuvent être utilisés pour corriger ceux obtenus dans les flacons F_T (par soustraction), en vue d'estimer l'ampleur de la biodégradation. Si des analyses facultatives sont effectuées sur les principaux produits de transformation, il faut fournir un tracé de leur formation et disparition en fonction du temps, en plus d'un tracé de la disparition de la substance d'essai.

On estime la durée de la phase de latence t_L à partir de la courbe de dégradation (tracé semi-logarithmique), en extrapolant sa partie linéaire jusqu'à une dégradation nulle ou en déterminant la durée d'une dégradation d'environ 10 % (voir figures 1a et 1b). À partir du tracé semi-logarithmique, on estime la constante de vitesse de premier ordre, k, et son écart-type par régression linéaire du ln (activité résiduelle du ^{14}C ou concentration de la substance d'essai) en fonction du temps. Avec les mesures du ^{14}C en particulier, on n'utilisera que les résultats se rapportant à la partie linéaire initiale de la courbe, située après la phase de latence, et l'on s'attachera à sélectionner un petit nombre de résultats représentatifs, plutôt qu'un grand nombre de résultats incertains. Ici, l'incertitude comprend les erreurs inhérentes à l'utilisation directe recommandée des activités résiduelles du ^{14}C mesurées (voir plus bas). Il peut parfois s'avérer pertinent de calculer deux constantes de vitesse différentes, si la dégradation suit un mode biphasique. À cet effet, on délimite deux phases différentes de la courbe de dégradation. Il convient de calculer la constante de vitesse, k, et la demi-vie, $t_{1/2} = \ln 2/k$, pour chacun des flacons des expériences identiques, lorsque des sous-échantillons sont prélevés à partir du même flacon, ou en utilisant les valeurs moyennes, lorsqu'on recueille des flacons entiers à chaque moment de prélèvement (voir paragraphe 1.8.9.2). Si l'on applique le premier procédé mentionné, la constante de vitesse et la demi-vie doivent être rapportées individuellement pour chacun des flacons en double et exprimées sous la forme d'une moyenne avec un écart-type. Si les concentrations de la substance d'essai sont élevées, la courbe de dégradation pourrait s'écarter considérablement d'une droite (tracé semi-logarithmique) et la cinétique de premier ordre risque de ne pas être valable. Dans ces circonstances, la détermination d'une demi-vie n'aurait pas de sens. Cependant, il est possible d'appliquer une cinétique de pseudo-premier ordre à une gamme limitée de résultats et d'estimer la demi-vie de dégradation TD_{50} (temps nécessaire pour atteindre 50 % de dégradation). On gardera toutefois à l'esprit qu'il est impossible de prédire la durée de la dégradation au-delà de la gamme limitée de résultats en utilisant la TD_{50}, qui n'est qu'un descripteur d'un ensemble donné de résultats. Les outils analytiques facilitant les calculs statistiques et l'ajustement des courbes sont faciles à se procurer et l'usage de ce type de logiciel est recommandé.

▼M1

Si des analyses chimiques spécifiques sont pratiquées, on estime les constantes de vitesse et les demi-vies pour la dégradation primaire comme indiqué plus haut pour la minéralisation totale. Si la dégradation primaire est le processus limitant, les résultats ponctuels se rapportant à la totalité du processus de dégradation peuvent quelquefois être utilisés. Et ce, parce qu'il s'agit de mesures directes, contrairement aux mesures de l'activité du ^{14}C.

Si l'on utilise des substances marquées au ^{14}C, le bilan massique devrait être exprimé en pourcentage de la concentration initiale appliquée, au moins à la fin de l'essai.

2.1.2. **Activité résiduelle**

Lorsque le fragment marqué au ^{14}C d'une substance organique est biodégradé, la majeure partie du ^{14}C est convertie en $^{14}CO_2$, tandis qu'une autre partie est mobilisée par la croissance de la biomasse et/ou la synthèse de métabolites extra-cellulaires. Aussi, la biodégradation complète, «finale», d'une substance ne correspond-elle pas à une conversion à 100 % de son carbone en $^{14}CO_2$. Le ^{14}C intégré aux produits biosynthétisés est ensuite libéré lentement sous la forme de $^{14}CO_2$ à la suite d'une «minéralisation secondaire». C'est pourquoi les tracés de l'activité du ^{14}C organique résiduel (mesurée après l'extraction du CO_2) ou du $^{14}CO_2$ produit en fonction du temps se prolongent au-delà de la fin de la dégradation. Cela complique l'interprétation cinétique des résultats, de sorte que seule la première partie de la courbe (juste après la fin de la phase de latence et avant que la dégradation atteigne environ 50 %) devrait normalement être utilisée pour l'estimation de la constante de vitesse de dégradation. Si la substance d'essai est dégradée, l'activité du ^{14}C résiduel organique total est toujours supérieure à l'activité du ^{14}C associée à la substance d'essai intacte restante. Si la substance d'essai est dégradée par une réaction de premier ordre et qu'une fraction constante α est minéralisée en CO_2, la pente initiale de la courbe de disparition du ^{14}C (^{14}C organique total en fonction du temps) sera égale à α fois la pente de la courbe correspondante de concentration de la substance d'essai (ou, plus précisément, du fragment de la substance d'essai marqué au ^{14}C). Les mesures de l'activité du ^{14}C organique total utilisées n'étant pas corrigées, la constante de vitesse de dégradation sera calculée avec une marge de sécurité. Des procédés permettant d'estimer les concentrations de la substance d'essai à partir des activités radiochimiques mesurées, sur la base de diverses hypothèses simplificatrices, ont été décrits dans des publications (2)(9)(10)(11). Ces procédés s'appliquent le plus facilement aux substances rapidement dégradables.

2.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

S'il s'avère que k est indépendant de la concentration (si le k calculé est à peu près identique aux différentes concentrations de la substance d'essai), on peut supposer que la constante de vitesse de premier ordre est représentative des conditions expérimentales appliquées, à savoir la substance d'essai, l'échantillon d'eau et la température de l'essai. Il appartient à un expert d'apprécier dans quelle mesure les résultats peuvent être généralisés ou extrapolés à d'autres systèmes. Si la substance d'essai est testée à une concentration élevée et que, de ce fait, la dégradation n'obéit pas à une cinétique de premier ordre, les résultats ne peuvent servir à estimer directement une constante de vitesse de premier ordre ou la demi-vie correspondante. Cependant, les données fournies par un essai mené à une concentration élevée de la substance d'essai peuvent toujours être utilisées pour estimer le degré de minéralisation totale et/ou détecter et quantifier les produits de transformation.

▼M1

Si les vitesses de phénomènes de disparition autres que la biodégradation sont connues (hydrolyse ou volatilisation, par exemple), elles peuvent être soustraites de la vitesse de disparition nette relevée durant l'essai, pour fournir une estimation approximative de la vitesse de biodégradation. Les valeurs concernant l'hydrolyse peuvent, par exemple, être obtenues à partir du témoin stérile ou d'un essai parallèle mené à une concentration plus élevée de la substance d'essai.

Les déterminations indirecte et directe du $^{14}CO_2$ (paragraphes 1.8.9.4 et annexe 3) ne peuvent être utilisées que pour mesurer l'ampleur de la minéralisation de la substance d'essai en CO_2. La radiochromatographie en couche mince (RAD-TLC) ou la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) peuvent servir à analyser la concentration de la substance d'essai marquée au ^{14}C et la formation des principaux produits de transformation (troisième alinéa du paragraphe 1.8.9.4). La demi-vie ne peut être estimée directement qu'en l'absence de tous les principaux produits de transformation (définis comme étant $\geq$10 % de la quantité de substance d'essai appliquée). En présence de produits de transformation principaux (selon la définition ci-dessus), une évaluation détaillée des résultats est requise. Cette évaluation peut inclure l'essai et/ou l'identification répétés des produits de transformation (voir premier alinéa du paragraphe 1.8.9.5), à moins que le devenir des produits de transformation ne puisse être raisonnablement évalué d'après l'expérience antérieure (par exemple, des informations sur les voies de dégradation). La proportion de carbone de la substance d'essai convertie en CO_2 variant (en grande partie en fonction de la concentration de la substance d'essai et des autres substrats disponibles, des conditions expérimentales et de la flore microbienne), cet essai ne permet pas d'estimer directement la biodégradation finale, comme dans un essai de disparition du carbone organique dissous; mais le résultat est similaire à celui obtenu avec l'essai au respiromètre. Le degré de minéralisation sera donc inférieur ou égal au degré minimal de biodégradation finale. Pour obtenir un tableau plus complet de la biodégradation finale (minéralisation et incorporation dans la biomasse), il faudrait analyser la répartition du ^{14}C entre les phases à la fin de l'essai (voir annexe 1). Le ^{14}C présent dans les matières particulaires consistera en ^{14}C incorporé dans la biomasse bactérienne et en ^{14}C sorbé sur les particules organiques.

2.3. VALIDITÉ DE L'ESSAI

Si la substance de référence ne se dégrade pas au cours de la période prévue (pour l'aniline et le benzoate de sodium, généralement moins de deux semaines), la validité de l'essai est incertaine et demande à être vérifiée; sinon, l'essai peut aussi être répété avec un nouvel échantillon d'eau. À l'issue d'un essai tournant de la méthode, organisé par l'ISO, auquel sept laboratoires européens ont participé, les constantes de vitesse de dégradation adaptées de l'aniline s'échelonnaient entre 0,3 et 1,7 jour $^{-1}$, avec une moyenne de 0,8 jour^{-1} à 20 °C et un écart-type de ± 0,4 jour^{-1} ($t_{1/2}$ = 0,9 jour). Les périodes de latence étaient généralement comprises entre un et sept jours. Les eaux examinées renfermaient une biomasse bactérienne correspondant à 10^3-10^4 unités formant colonie par ml. Les eaux riches en éléments nutritifs de l'Europe tempérée accusaient des vitesses de dégradation supérieures aux eaux oligotrophes de l'Europe septentrionale, probablement à cause d'une différence d'état trophique ou d'une exposition préalable à des substances chimiques.

La récupération totale (bilan massique) à la fin de l'expérience devrait se situer entre 90 % et 110 % pour les substances radiomarquées, tandis que le taux de récupération au début de l'expérience devrait être compris entre 70 % et 110 % pour les substances non marquées. Toutefois, ces gammes ne sont mentionnées qu'à titre indicatif et ne devraient pas servir de critère d'acceptation pour l'essai.

▼M1

3. **RAPPORT D'ESSAI**

Le type d'essai, à savoir pélagique ou en suspension de sédiments, doit être stipulé clairement dans le rapport d'essai, qui fournira également, au minimum, les informations suivantes:

Substance d'essai et substance(s) de référence:

— noms courants, noms chimiques (suivant la nomenclature recommandée par l'IUPAC et/ou le CAS), numéros CAS, formule structurale (indiquant la position du ^{14}C, dans le cas d'une substance radiomarquée) et propriétés physico-chimiques pertinentes de la substance d'essai et de la (des) substance(s) de référence (voir paragraphes 1.5 et 1.6),

— noms chimiques, numéros CAS, formule structurale (indiquant la position du ^{14}C, dans le cas d'une substance radiomarquée) et propriétés physico-chimiques pertinentes des substances servant d'étalon pour l'identification et la quantification des produits de transformation,

— pureté (impuretés) de la substance d'essai et de la (des) substance(s) de référence,

— pureté radiochimique de la substance marquée et activité spécifique (le cas échéant).

Eau superficielle:

Il convient de fournir, au minimum, les informations suivantes sur l'échantillon d'eau prélevé:

— localisation et description du site de prélèvement et, si possible, son histoire en matière de contamination,

— date et heure du prélèvement de l'échantillon,

— éléments nutritifs (N total, ammonium, nitrite, nitrate, P total, orthophosphate dissous),

— profondeur du prélèvement,

— aspect de l'échantillon (couleur et turbidité, par exemple),

— carbone organique dissous et carbone organique total,

— demande biologique en oxygène,

— température et pH sur le lieu et à l'heure du prélèvement,

— oxygène ou potentiel redox (obligatoire seulement si l'aérobiose n'est pas évidente),

— salinité ou conductivité (dans le cas d'une eau de mer ou d'une eau saumâtre),

— solides en suspension (dans le cas d'un échantillon trouble),

— éventuellement, autres informations pertinentes sur le lieu de prélèvement au moment du prélèvement (par exemple, données actuelles ou antérieures sur le débit des cours d'eau ou les courants marins, présence d'importantes sources de rejets à proximité et nature des rejets, conditions météorologiques précédant le moment du prélèvement),

et, à titre facultatif:

— biomasse microbienne (comptage direct à l'orangé d'acridine ou unités formant colonie, par exemple),

▼M1

— carbone minéral,

— estimation de la biomasse des algues d'après la concentration en chlorophylle a.

De surcroît, si l'essai est réalisé en suspension de sédiments, il faudrait fournir les renseignements suivants sur le sédiment:

— profondeur de prélèvement du sédiment,

— aspect du sédiment (coloré, boueux, vaseux ou sableux, par exemple),

— texture (pourcentages de sable grossier, de sable fin, de limon et d'argile, par exemple),

— poids sec en g/l des solides suspendus, concentration du carbone organique total ou mesure de la teneur en matière organique d'après la perte de poids à l'inflammation,

— pH,

— oxygène ou potentiel redox (obligatoire seulement si l'aérobiose n'est pas évidente).

Conditions expérimentales:

— temps écoulé entre le prélèvement de l’échantillon et son utilisation dans l'essai en laboratoire, stockage et traitement préalable de l'échantillon, dates auxquelles les études ont été menées,

— quantité de substance d'essai appliquée, concentration expérimentale et substance(s) de référence,

— méthode d'application de la substance d'essai, notamment utilisation de solvants, le cas échéant,

— volume d'eau superficielle utilisé, et de sédiment le cas échéant, et volume prélevé à chaque moment d'analyse,

— description du système expérimental utilisé.

Si l'obscurité ne s'impose pas, informations sur les paramètres de la lumière diffuse,

— informations sur la ou les méthodes utilisées pour préparer des témoins stériles (température, durée et nombre d'autoclavages, par exemple),

— température d'incubation,

— renseignements sur les techniques analytiques et la ou les méthodes appliquées pour les mesures radiochimiques, la vérification du bilan massique et la détermination de la répartition entre les phases (le cas échéant),

— nombre d'expériences identiques.

Résultats:

— pourcentages de récupération (voir paragraphe 1.7.1),

— répétabilité et sensibilité des méthodes analytiques employées, y compris les seuils de détection et de quantification (voir paragraphe 1.7.2),

▼**M1**

— toutes les données mesurées (y compris les heures de prélèvement), les valeurs calculées présentées sous forme de tableau et les courbes de dégradation; pour chaque concentration expérimentale et chaque flacon en double, indiquer le coefficient de corrélation linéaire de la pente du tracé logarithmique, la durée estimée de la phase de latence, une constante de vitesse de premier ordre ou de pseudo-premier ordre (si possible) et la demi-vie de dégradation correspondante (ou le temps de demi-vie, $t_{1/2}$),

— consigner les valeurs importantes telles que les moyennes des résultats observés pour chaque double, par exemple la longueur de la phase de latence, la constante de vitesse de dégradation et la demi-vie de dégradation (ou $t_{1/2}$),

— déterminer si le système est adapté ou non, d'après l'aspect de la courbe de dégradation et l'influence éventuelle de la concentration d'essai,

— résultats de la vérification du bilan massique final et résultats des mesures de la répartition entre les phases (le cas échéant),

— fraction de ^{14}C minéralisé et, si des analyses spécifiques ont été menées, niveau final de la dégradation primaire,

— identification, concentration molaire et pourcentage des principaux produits de transformation (voir premier alinéa du paragraphe 1.8.9.5), le cas échéant,

— proposition d'un chemin réactionnel pour la transformation, s'il y a lieu,

— analyse des résultats.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water — Simulation Biodegradation Test

2. ISO/DIS 14592-1 (1999). Qualité de l'eau — évaluation de la biodégradabilité aérobie des composés organiques présents en faibles concentrations — partie 1: essai en lots de flacons agités avec des eaux de surface ou des suspensions eaux de surface/sédiments.

3. Méthode d'essai C.23. Transformation aérobie et anaérobie dans le sol.

4. Méthode d'essai C.24. Transformation aérobie et anaérobie dans les systèmes sédimentaires aquatiques.

5. OCDE (1993). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. OCDE, Paris.

6. ISO 8245 (1999). Qualité de l'eau — lignes directrices pour le dosage du carbone organique total (COT) et du carbone organique dissous (COD).

7. ISO 10634 (1995). Qualité de l'eau — lignes directrices pour la préparation et le traitement des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux.

8. OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. N° 22 (to be published summer 2000).

▼**M1**

9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol.47, 394-401.

10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274-283.

11. ISO/CD 14592-1 (1999). Qualité de l'eau — évaluation de la biodégradabilité aérobie des composés organiques présents en faibles concentrations — partie 1: essai en lots de flacons agités avec des eaux de surface ou des suspensions eaux de surface/sédiments.

▼M1

Appendice 1

Répartition du ^{14}C entre les phases

Afin de contrôler le procédé employé, il convient de compléter les mesures systématiques de l'activité totale du ^{14}C organique (AOT) résiduel par des mesures du bilan massique comportant une détermination directe du $^{14}CO_2$ émis après piégeage dans un absorbeur (voir annexe 3). En soi, la formation de $^{14}CO_2$ constitue une preuve directe de biodégradation, par opposition à la dégradation abiotique ou à d'autres mécanismes de disparition, tels que la volatilisation et la sorption. D'autres renseignements utiles caractérisant la biodégradabilité peuvent être tirés des mesures de la répartition de l'AOT entre la phase dissoute (activité du ^{14}C organique dissous, AOD) et la phase particulaire (activité du ^{14}C organique particulaire, AOP), après la séparation des particules par filtration sur membrane ou centrifugation. L'AOP se rapporte à la substance d'essai sorbée sur la biomasse microbienne et sur d'autres particules ainsi qu'au carbone de la substance d'essai qui a été mobilisé pour synthétiser de nouveaux matériaux cellulaires et incorporé de ce fait dans la fraction particulaire de la biomasse. La formation du ^{14}C organique dissous peut être estimée d'après l'AOD à la fin de la biodégradation (plateau sur la courbe de dégradation en fonction du temps).

On estime la répartition du ^{14}C résiduel entre les phases dans des échantillons choisis en filtrant les échantillons sur un filtre à membrane composé d'un matériau qui n'adsorbe, le cas échéant, que des quantités négligeables de la substance d'essai (les filtres en polycarbonate, par exemple, conviennent) et dont les pores mesurent 0,22 μm ou 0,45 μm. Si la sorption de la substance d'essai sur le filtre est trop importante pour être négligée (à vérifier avant l'expérience), la filtration peut être remplacée par une centrifugation à grande vitesse (2 000 g; 10 min).

Le filtrat ou le centrifugat sont traités comme les échantillons non filtrés (voir à l'annexe 3). Les membranes des filtres sont dissoutes dans un liquide à scintillation approprié, et le comptage s'effectue comme d'habitude, en principe uniquement à l'aide de la méthode du quotient avec un étalon externe pour corriger l'extinction, ou à l'aide d'un dispositif oxydant l'échantillon. Si l'on a utilisé la centrifugation, il faut de nouveau suspendre la boulette formée par la fraction particulaire dans 1 à 2 ml d'eau distillée et transférer le tout dans un petit tube à scintillation. Après deux rinçages du tube à centrifuger avec 1 ml d'eau distillée, l'eau de rinçage est transférée dans le petit tube à scintillation. Si nécessaire, la suspension peut être incorporée à un gel pour le comptage par scintillation liquide.

▼**M1**

Appendice 2

Procédé semi-continu

Il est parfois nécessaire de prolonger l'incubation durant plusieurs mois afin de dégrader suffisamment les substances récalcitrantes. L'essai ne doit normalement pas dépasser 60 jours, sauf si les caractéristiques de l'échantillon d'eau original sont maintenues grâce au renouvellement de la suspension d'essai. Cependant, la durée de l'essai peut être prolongée jusqu'à 90 jours maximum sans renouvellement de la suspension d'essai si la dégradation de la substance d'essai a débuté au cours des 60 premiers jours.

Si l'incubation couvre une longue période, la diversité de la flore microbienne risque de s'amenuiser, du fait de divers mécanismes de disparition et de l'appauvrissement possible de l'échantillon d'eau en éléments nutritifs essentiels et en substrats carbonés primaires. Il est donc recommandé de recourir à l'essai semi-continu pour déterminer correctement la vitesse de dégradation des substances qui se dégradent lentement. L'essai devrait débuter par un procédé semi-continu si des données expérimentales laissent supposer qu'une période d'incubation de trois mois est nécessaire pour que la substance se dégrade à 20 %. Sinon, l'essai en lots peut être converti en essai semi-continu si la substance d'essai ne s'est pas dégradée au terme d'un essai en lots mené sur une soixantaine de jours. Il est possible de mettre fin à un essai semi-continu et de poursuivre l'expérience selon le procédé en lots si une dégradation substantielle a été enregistrée (> 20 %, par exemple).

Dans l'essai semi-continu, toutes les deux semaines, environ un tiers du volume de la suspension d'essai est remplacé par un volume d'eau venant d'être prélevé, dans lequel a été ajoutée la quantité requise de substance d'essai pour rétablir sa concentration initiale. De la même façon, on ajoute la quantité nécessaire de sédiment dans l'eau de remplacement pour rétablir la concentration initiale de sédiment (entre 0,01 et 1 g/l) si l'on effectue l'essai facultatif en suspension de sédiments. Si l'essai est mené avec des sédiments solides en suspension, il importe que le système demeure totalement suspendu et ce, également lors du renouvellement de l'eau, et il convient d'appliquer un temps de séjour identique pour les solides et l'eau, sinon on risquerait de perdre la similarité voulue avec un système aqueux homogène sans phases fixes. C'est pourquoi, il est préférable que la concentration initiale des sédiments suspendus se situe dans la partie inférieure de l'intervalle spécifié lorsqu'on utilise un procédé semi-continu.

L'ajout de la substance d'essai, tel qu'il est prescrit, implique que le renouvellement partiel de la suspension d'essai n'entraîne pas de dépassement de la concentration initiale de la substance d'essai, et que l'on évite par conséquent l'adaptation couramment observée avec des concentrations élevées de la substance d'essai. Le procédé prévoyant une réinoculation et une compensation des carences en éléments nutritifs et en substrats primaires, la diversité microbienne originale est rétablie et la durée de l'essai peut, en principe, être prolongée à l'infini. Lorsqu'on applique le procédé semi-continu, il est important de noter que la concentration résiduelle de la substance d'essai doit être corrigée en fonction des quantités de substance d'essai ajoutées et ôtées à chaque renouvellement. La concentration totale de la substance d'essai et sa concentration à l'état dissous peuvent être utilisées de façon interchangeable pour les composés peu sujets à la sorption. La sorption est négligeable (< 5 %) dans les conditions spécifiées (0,1-1 g solides/l) pour les substances dont le log K_{oe} < 3 (valable pour les substances neutres, lipophiles). L'exemple de calcul présenté ci-dessous illustre ce qui précède. En gros, 0,1 g/l de solides correspond à 10 mg de carbone par litre (fraction de carbone f_C = 0,01). Soit:

Log K_{oe} (de la substance d'essai) = 3

$K_{co} = 0{,}42 \times K_{oe}$

Coefficient de partage, $K_d = f_C \times K_{co}$

alors, la fraction dissoute de la concentration totale (C-eau (C_e)/C-total (C_t)) est égale à:

$C_e/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{co} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Appendice 3

Détermination du $^{14}CO_2$

Détermination indirecte du $^{14}CO_2$

Pour les mesures systématiques, la méthode indirecte est normalement la plus rapide et la plus précise, si la substance d'essai est non volatile et ne se transforme pas en produits volatils. Pour ce faire, il suffit de transférer des échantillons non filtrés, d'un volume de 5 ml, par exemple, dans des tubes à scintillation. L'activité initiale adéquate des échantillons est comprise entre 5 000 dpm et 10 000 dpm (80-170 Bq) et l'activité initiale minimale est de quelque 1 000 dpm. Le CO_2 doit être extrait après acidification à pH 2-3 avec une ou deux gouttes d'H_3PO_4 ou d'HCl concentrés. L'extraction du CO_2 peut se faire par barbotage à l'air durant une demi-heure à une heure. Sinon, les flacons peuvent être agités vigoureusement durant une à deux heures (par exemple, sur un agitateur à microplaque) ou plus doucement, mais jusqu'au lendemain. Il faut vérifier l'efficacité du procédé d'extraction du CO_2 (en prolongeant l'aération ou la durée de l'agitation). Ensuite, un liquide à scintillation approprié au comptage des échantillons aqueux est ajouté et l'échantillon est homogénéisé au moyen d'un mélangeur rotatif; on détermine la radioactivité par comptage en scintillation liquide en retranchant l'activité de fond relevée sur les témoins (F_B). À moins que l'eau d'essai ne soit très colorée ou renferme une concentration élevée de particules, les échantillons présentent normalement une extinction uniforme et il suffit de corriger l'extinction à l'aide d'un étalon externe. Si l'eau d'essai est très colorée, il peut être nécessaire de corriger l'extinction par ajout d'un étalon interne. Si la concentration des particules est élevée, il peut s'avérer impossible d'obtenir une solution ou un gel homogène, ou la variation d'extinction entre les échantillons risque d'être importante. Dans ce cas, la méthode de comptage décrite ci-après pour les boues d'essai peut être utilisée. Si l'essai est mené en suspension de sédiments, on peut mesurer le $^{14}CO_2$ indirectement en prenant un échantillon homogène de 10 ml de l'eau/suspension d'essai et en séparant les phases par centrifugation à une vitesse appropriée (par exemple à 40 000 m/s^2 durant 15 min). La phase aqueuse doit ensuite être traitée comme décrit plus haut. On détermine l'activité du ^{14}C de la phase particulaire (AOP) en suspendant de nouveau le sédiment dans un petit volume d'eau distillée, en le transférant dans des tubes à scintillation et en ajoutant un liquide à scintillation de façon à obtenir un gel (il existe des liquides à scintillation spécialement destinés à cet usage). Selon la nature des particules (par exemple, leur teneur en matières organiques), il peut être possible de faire digérer l'échantillon par un solubilisant pour tissus en le laissant agir jusqu'au lendemain et de l'homogénéiser ensuite avec un mélangeur rotatif, avant d'ajouter le liquide à scintillation. Sinon, l'AOP peut être déterminée par combustion en excès d'oxygène au moyen d'un dispositif oxydant l'échantillon. Des étalons internes doivent toujours être inclus lors du comptage, et il est parfois nécessaire de corriger l'extinction en ajoutant un étalon interne pour chaque échantillon.

Détermination directe du $^{14}CO_2$

Si le $^{14}CO_2$ dégagé est mesuré directement, il faut prévoir un plus grand nombre de flacons au début de l'essai, prélever les flacons d'essai à chaque moment de mesure, acidifier leur contenu à pH 2-3 et recueillir le $^{14}CO_2$ dans un absorbeur interne (disposé dans chaque flacon d'essai au début de l'essai) ou externe. Un milieu absorbant alcalin (par exemple, une solution 1 N de NaOH ou une pastille de NaOH), ou constitué d'éthanolamine ou à base d'éthanolamine, ainsi que les absorbeurs vendus dans le commerce peuvent être utilisés. Pour la mesure directe du $^{14}CO_2$, les flacons doivent être fermés au moyen de bouchons cloisonnés (septa) en caoutchouc butylique, par exemple.

▼**M1**

Figure 1a

Exemple d'un tracé arithmétique des résultats (activité résiduelle en fonction du temps)

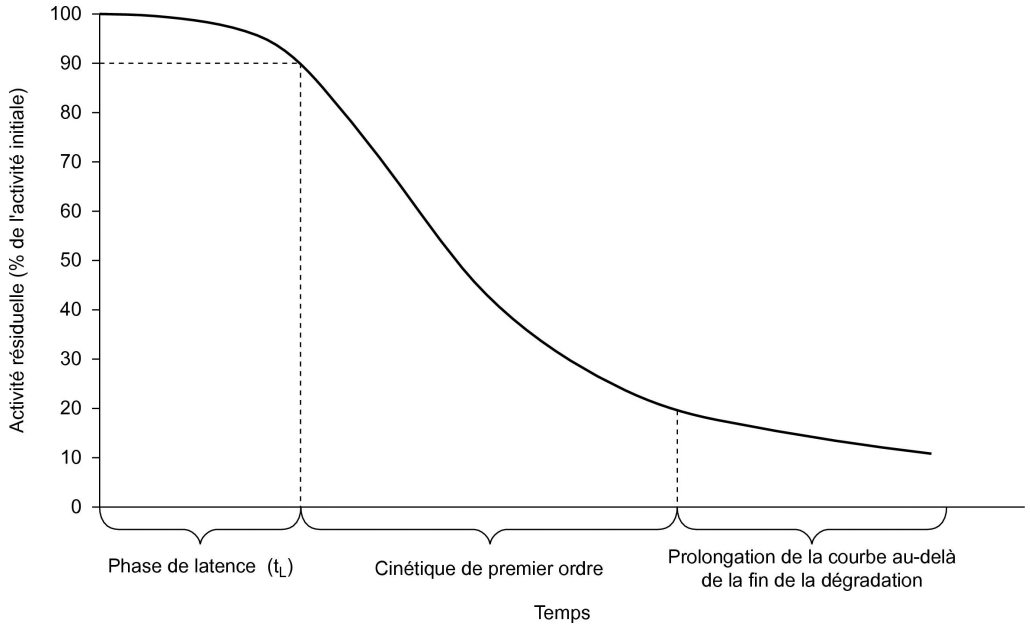
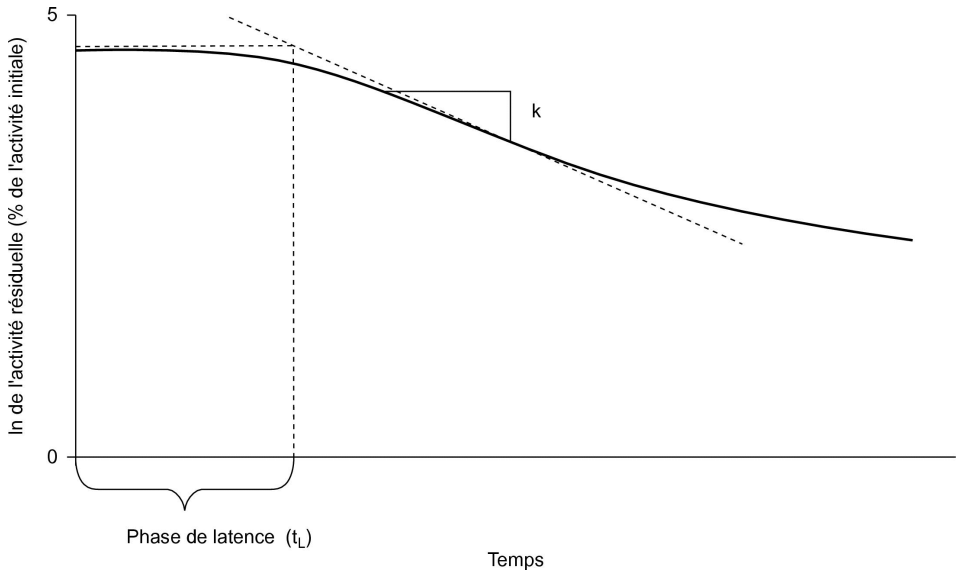


Figure 1b

Exemple de tracé semi-logarithmique des résultats (ln de l'activité résiduelle en fonction du temps)



▼M6

C.26. LEMNA SP. ESSAI D'INHIBITION DE LA CROISSANCE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 221 (2006) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Elle est destinée à évaluer la toxicité de substances chimiques sur des plantes dulcicoles du genre *Lemna* (lentille d'eau). Conçue à partir de méthodes existantes (1)(2)(3)(4)(5)(6), elle comporte des modifications reflétant les dernières avancées en recherche et des consultations d'experts sur un certain nombre de points essentiels. La présente méthode d'essai a été validée par un essai tournant international (7).

2. Elle décrit des essais de toxicité sur *Lemna gibba* et *Lemna minor*, deux espèces abondamment étudiées et visées par les références susmentionnées. La taxonomie des espèces du genre *Lemna* est complexe, notamment à cause de l'existence des nombreux phénotypes. Bien qu'il puisse y avoir une variation génétique pour la réaction des espèces de *Lemna* aux toxiques, nous ne sommes pas encore en mesure de recommander l'usage d'un clone particulier pour cette méthode d'essai, faute de données suffisantes sur cette source de variabilité. Notons que cet essai n'est pas conduit dans des conditions axéniques, mais qu'à différentes étapes du mode opératoire il inclut des mesures permettant de limiter au maximum la contamination par d'autres organismes.

3. Les procédés avec renouvellement (semi-statique, et à écoulement continu dit «dynamique») et sans renouvellement (statique) de la solution expérimentale sont décrits en détail. En fonction des objectifs de l'essai et des exigences réglementaires, on envisagera d'appliquer les méthodes semi-statique et dynamique, par exemple pour les substances chimiques qui disparaissent rapidement de la solution par volatilisation, photodégradation, précipitation ou biodégradation. Des orientations supplémentaires sont fournies dans la référence (8).

4. Les termes utilisés sont définis à l'Appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

5. Des monocultures du genre *Lemna*, en phase de croissance exponentielle, sont exposées à différentes concentrations de la substance chimique d'essai sur une période de sept jours. Cet essai vise à quantifier les effets de la substance sur la multiplication végétative des lentilles d'eau durant cette période, d'après l'évaluation de plusieurs variables choisies. Le nombre de thalles représente la première variable mesurée, mais on en détermine au moins une autre (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) car certaines substances sont susceptibles d'avoir un impact beaucoup plus prononcé sur des variables autres que le nombre de thalles. Afin de quantifier les effets de la substance, la croissance des lentilles d'eau dans les solutions expérimentales est comparée à celle des témoins et la concentration induisant un pourcentage défini d'inhibition de la croissance (par exemple 50 %) est déterminée et exprimée sous la forme de CE_x (par exemple CE_{50}).

6. Dans cet essai, l'effet observé est l'inhibition de la croissance, exprimé en termes d'accroissement logarithmique de la variable mesurée (taux de croissance spécifique moyen) durant la période d'exposition. La concentration entraînant un pourcentage donné d'inhibition du taux de croissance (par exemple 50 %) est déterminée en fonction des taux de croissance spécifiques moyens relevés dans une série de solutions expérimentales et exprimée sous la forme C_xE_t (par exemple $C_{50}E_t$).

7. Cette méthode d'essai comporte également une variable étudiée supplémentaire, le rendement, requise par la réglementation de certains pays. Il est défini comme étant la différence entre la valeur des variables mesurées à la fin de la période d'exposition et la valeur des variables mesurées au début de la période d'exposition. La concentration entraînant un pourcentage donné d'inhibition du rendement (par exemple 50 %) est calculée à partir du rendement enregistré dans une série de solutions expérimentales et exprimée en termes de C_xE_y (par exemple $C_{50}E_y$).

▼M6

8. En outre, la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et la concentration sans effet observé (CSEO) peuvent être déterminées par un calcul statistique.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE CHIMIQUE D'ESSAI

9. Il faudrait disposer d'une méthode analytique suffisamment sensible pour quantifier la substance d'essai dans le milieu expérimental.

10. Les informations sur la substance chimique d'essai pouvant être utiles à l'établissement des conditions expérimentales comprennent la formule structurale, la pureté, l'hydrosolubilité, la stabilité dans l'eau et à la lumière, le pK_a, le K_{oe}, la pression de vapeur et la biodégradabilité. L'hydrosolubilité et la pression de vapeur peuvent être utilisées pour calculer la constante de Henry, qui indiquera si des pertes appréciables de la substance chimique d'essai risquent de se produire durant la période de l'essai. On saura ainsi s'il y a lieu de prendre des mesures particulières afin de limiter ces pertes. Si la solubilité et la stabilité de la substance chimique d'essai ne sont pas connues avec certitude, il est recommandé de les évaluer dans les conditions de l'essai, c'est-à-dire dans le milieu expérimental ainsi qu'à la température et sous le régime d'éclairage appliqués durant l'essai.

11. Si la maîtrise du pH du milieu expérimental est particulièrement importante, par exemple lorsqu'on teste des métaux ou des substances chimiques hydrolytiquement instables, il est recommandé d'ajouter un tampon au milieu de croissance (voir paragraphe 21). D'autres indications sur le traitement des substances chimiques qui se prêtent difficilement à cet essai en raison de leurs propriétés physico-chimiques sont données dans la référence (8).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

12. Pour que l'essai soit valable, le temps de dédoublement du nombre de thalles chez les témoins doit être inférieur à 2,5 jours (60 heures), ce qui correspond approximativement à une multiplication par sept de ce nombre en sept jours et à un taux de croissance spécifique moyen de 0,275 $jour^{-1}$. Si l'on utilise le milieu et les conditions expérimentales décrits dans la présente méthode d'essai, ce critère peut être atteint avec une méthode d'essai statique (5). Ce critère devrait aussi pouvoir être rempli dans des conditions semi-statiques et dynamiques. Le calcul du temps de dédoublement est exposé au paragraphe 49.

SUBSTANCE CHIMIQUE DE RÉFÉRENCE

13. Des substances chimiques de référence telles que le 3,5-dichlorophénol utilisé dans l'essai circulaire international (7) peuvent servir à vérifier le procédé expérimental. Il est conseillé de tester la substance de référence au moins deux fois par an ou, si l'essai est conduit moins fréquemment, parallèlement à la détermination de la toxicité de la substance chimique d'essai.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

14. Tout le matériel entrant en contact avec le milieu expérimental doit être en verre ou fait d'un autre matériau chimiquement inerte. La verrerie destinée aux cultures et à l'essai doit être stérile et nettoyée de tous les contaminants chimiques risquant d'être lessivés dans le milieu d'essai. Les récipients d'essai doivent être suffisamment larges pour permettre aux thalles des différentes colonies dans les récipients témoins de croître sans se recouvrir à la fin de l'essai. Il importe peu que les racines touchent le fond des récipients d'essai, mais il est conseillé d'utiliser des récipients d'essai d'une profondeur minimale de 20 mm et d'un volume minimal de 100 ml. Tout récipient répondant à ces critères peut être utilisé. Des béchers en verre, des cristallisoirs et des boîtes de Petri en verre aux dimensions appropriées se sont avérés adéquats. Les récipients d'essai seront couverts pour minimiser l'évaporation et la

▼M6

contamination accidentelle, tout en autorisant les échanges nécessaires avec l'air. Les récipients d'essai, et en particulier leurs couvercles, ne doivent pas réduire l'intensité lumineuse ni modifier les caractéristiques spectrales de la lumière.

15. Les récipients expérimentaux et ceux contenant les cultures ne doivent pas être conservés ensemble. Le meilleur moyen d'y parvenir consiste à les garder dans des enceintes de croissance, des incubateurs ou des pièces séparés. Il faut pouvoir régler l'éclairage et la température et les maintenir à un niveau constant (voir paragraphes 35-36).

Organisme expérimental

16. Cet essai se pratique sur *Lemna gibba* ou *Lemna minor*. L'Appendice 2 fournit une brève description condensée des espèces de lentilles d'eau ayant servi à des essais de toxicité. Le matériel végétal peut être obtenu auprès d'une collection de cultures, d'un autre laboratoire ou récolté sur le terrain. Dans ce dernier cas, les plantes doivent être maintenues dans le même milieu que celui qui servira à l'essai durant au moins huit semaines avant leur utilisation. Les cultures de départ ne seront prélevées que sur des sites manifestement non contaminés. Si les cultures proviennent d'un autre laboratoire ou d'une collection de cultures, elles seront également maintenues dans le même milieu que celui de l'essai durant au moins trois semaines. La source du matériel végétal ainsi que l'espèce et le clone (s'il est connu) utilisés pour l'essai doivent toujours figurer sur le rapport.

17. Il convient d'utiliser des monocultures visiblement non contaminées par d'autres organismes tels que des algues et des protozoaires. Les représentants sains de *L. minor* forment des colonies de deux à cinq thalles tandis que les colonies saines de *L. gibba* peuvent comprendre jusqu'à sept thalles.

18. La qualité et l'uniformité des plantes utilisées pour l'essai sont susceptibles d'avoir une influence sensible sur le résultat de l'essai et les plantes doivent par conséquent être choisies avec soin. On utilisera des plantes jeunes, en croissance rapide et dépourvues de lésions visibles ou de parties décolorées (chlorose). Une fréquence élevée de colonies comprenant au moins deux thalles atteste la bonne qualité des cultures. Un nombre important de thalles uniques indique que les plantes vivent dans des conditions de stress, telles qu'un manque en éléments nutritifs, et le matériel végétal issu de ces cultures ne peut servir à l'essai.

Culture

19. Afin d'alléger le travail d'entretien des cultures (par exemple lorsque aucun essai n'est prévu sur les *Lemna* durant un certain temps), les cultures peuvent être gardées sous un éclairage et une température réduits (4-10 °C). L'Appendice 3 fournit des précisions sur la culture. En cas de contamination visible par des algues ou d'autres organismes, il convient de stériliser en surface un sous-échantillon de thalles de *Lemna* et de le transférer dans un milieu nouvellement préparé (voir Appendice 3). Dans cette éventualité, le reste de la culture contaminée est à éliminer.

20. Au moins sept jours avant l'essai, un nombre suffisant de colonies est transféré aseptiquement dans un milieu frais stérile et cultivé durant 7 à 10 jours dans les conditions de l'essai.

Milieu expérimental

21. Les différents milieux recommandés pour *Lemna minor* et *Lemna gibba* sont décrits ci-après. La prudence sera de rigueur en ce qui concerne l'ajout d'un tampon au milieu d'essai (MOPS (acide 4-morpholinepropanesulfonique, numéro CAS: 1132-61-2) au milieu de *L. minor* et $NaHCO_3$ au milieu de *L. gibba*) si l'on soupçonne le tampon de réagir avec la substance chimique d'essai et d'influencer l'expression de sa toxicité. Le milieu de Steinberg (9) est acceptable pour autant que les critères de validité soient respectés.

▼M6

22. On préconise de cultiver et de tester L. minor sur une version modifiée du milieu de croissance pour Lemna établi par la norme suédoise (SIS). La composition de cette version modifiée est indiquée à l'Appendice 4.

23. Le milieu de croissance 20X — AAP, décrit à l'Appendice 4, est recommandé pour la culture et l'essai de L. *gibba*.

24. Le milieu de Steinberg, décrit à l'Appendice 4, convient à *L. minor*, mais peut aussi être employé pour *L. gibba* à condition que les critères de validité soient respectés.

Solutions expérimentales

25. Les solutions expérimentales sont généralement préparées par dilution d'une solution mère, elle-même préparée par dissolution de la substance chimique dans le milieu de croissance.

26. La plus haute concentration testée de la substance chimique d'essai ne doit normalement pas dépasser l'hydrosolubilité de la substance dans les conditions de l'essai. Il est à noter toutefois que les espèces du genre *Lemna* flottent à la surface et risquent d'être exposées à des substances qui s'accumulent à l'interface eau-air (par exemple des substances peu solubles dans l'eau ou hydrophobes ou des tensio-actifs). Dans ces circonstances, l'exposition résultera de substances autres que celles qui sont en solution, de sorte que les concentrations expérimentales pourraient, suivant les caractéristiques de la substance chimique d'essai, dépasser la solubilité dans l'eau. Pour les substances chimiques d'essai peu solubles dans l'eau, il peut être nécessaire de préparer une solution mère concentrée ou une dispersion de la substance au moyen d'un solvant organique ou d'un dispersant, afin de faciliter l'ajout de quantités précises de substance chimique d'essai au milieu expérimental et de favoriser sa dispersion et sa dissolution. Le recours à ces auxiliaires doit être évité dans toute la mesure du possible. Les solvants ou les dispersants auxiliaires ne doivent induire de phytotoxicité. L'acétone et le diméthylformamide sont des exemples de solvants courants qui n'engendrent aucune phytotoxicité à des concentrations allant jusqu'à 100 µl/l. Si l'on utilise un solvant ou un dispersant, sa concentration finale doit être limitée et ne peut pas dépasser 100 µl/l, doit être identique dans tous les récipients traités et témoins et spécifiée dans le rapport. La référence (8) donne des indications supplémentaires sur l'utilisation des dispersants.

Groupes traités et témoins

27. Il est utile de cerner la toxicité de la substance chimique d'essai à l'égard de *Lemna*, par exemple à l'aide d'un essai de détermination de l'ordre de grandeur, afin d'établir des concentrations expérimentales pertinentes. L'essai de toxicité proprement dit doit comprendre au moins cinq concentrations formant une série géométrique. Il est préférable que les concentrations expérimentales ne soient pas séparées par un facteur supérieur à 3,2, mais on peut appliquer un facteur plus élevé si la courbe concentration-effet a une pente nulle. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. Il faut conduire au moins trois expériences identiques à chaque concentration.

28. Le choix de la gamme des concentrations d'essai (de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur ou de l'essai de toxicité) doit tenir compte des aspects suivants:

— Pour déterminer la CE_x, les concentrations expérimentales doivent entourer la valeur de la CE_x afin que le niveau de confiance soit suffisant. Par exemple, s'il s'agit d'estimer la CE_{50}, la concentration expérimentale la plus élevée doit dépasser la valeur de la CE_{50}. Si la CE_{50} sort de la gamme des concentrations expérimentales, les intervalles de confiance seront larges et il risque d'être impossible d'évaluer correctement la validité de l'ajustement statistique du modèle.

— S'il s'agit d'estimer la CMEO et la CSEO, la plus petite concentration expérimentale doit être suffisamment basse pour que la croissance des lentilles d'eau ne soit pas ralentie de manière significative par rapport à celle des témoins. De plus, la concentration expérimentale la plus élevée

▼M6

doit être suffisamment élevée pour que la croissance soit sensiblement inférieure à celle des témoins. Si ce n'est pas le cas, l'essai devra être répété à une gamme de concentrations différente (à moins que la concentration la plus élevée atteigne la limite de solubilité ou, la concentration limite supérieure autorisée, par exemple 100 mg/l).

29. Chaque essai doit inclure des témoins sans substance chimique d'essai, mais identiques aux récipients traités pour ce qui est du milieu nutritif, du nombre de thalles et de colonies, des conditions environnementales et du procédé expérimental. Si l'on utilise un solvant ou un dispersant auxiliaire, il faut inclure un témoin supplémentaire contenant le solvant ou le dispersant à la même concentration que dans les récipients contenant la substance chimique d'essai. Le nombre de récipients témoins identiques (et de témoins contenant le solvant, le cas échéant) doit être au moins égal, et idéalement deux fois supérieur, au nombre de récipients d'essai utilisés à chaque concentration expérimentale.

30. Si la détermination de la CSEO n'est pas requise, la conception de l'essai peut être modifiée pour augmenter le nombre de concentrations et diminuer le nombre d'expériences identiques par concentration. Toutefois, le nombre de témoins identiques doit être au moins égal à trois.

Exposition

31. Des colonies formées de 2 à 4 thalles visibles sont prélevées dans la culture de l'inoculum et réparties au hasard dans les récipients d'essai dans des conditions aseptiques. Chaque récipient d'essai doit contenir 9 à 12 thalles au total. Le nombre de thalles et de colonies doit être identique dans chaque récipient d'essai. L'expérience acquise avec cette méthode et l'essai tournant montrent que l'utilisation de trois expériences identiques par traitement, comprenant chacune 9 à 12 thalles au départ, suffit pour détecter des différences de croissance entre les traitements d'environ 4 à 7 % d'inhibition, si celles-ci sont calculées d'après le taux de croissance, et de 10 à 15 % si elles sont calculées d'après le rendement (7).

32. L'emplacement des récipients expérimentaux dans l'incubateur doit être aléatoire, afin de réduire au minimum l'influence des différences spatiales d'intensité lumineuse ou de température. La disposition des récipients au moment d'effectuer les observations (ou plus souvent de remettre en place les récipients) est également régie par un plan en blocs ou une procédure aléatoire.

33. Si un essai de stabilité préliminaire montre que la concentration de la substance chimique d'essai ne peut être maintenue (la concentration mesurée tombe en dessous de 80 % de la concentration mesurée initialement) sur la durée de l'essai (7 jours), on recommande la méthode semi-statique. Dans ce cas, les colonies doivent être exposées au moins deux fois durant l'essai (par exemple les troisième et cinquième jours) à des solutions d'essai et à des solutions témoins nouvellement préparées. La fréquence de l'exposition à un milieu renouvelé dépendra de la stabilité de la substance chimique d'essai: une fréquence plus élevée peut s'avérer nécessaire pour maintenir des concentrations presque constantes dans le cas de substances très instables ou volatiles. Certaines circonstances appellent une méthode dynamique (8)(10).

34. La voie d'exposition par application foliaire (pulvérisation) n'est pas reprise dans cette méthode d'essai, mais la référence (11) donne des informations à ce sujet.

Conditions d'incubation

35. On applique un éclairage continu à fluorescence blanche, chaude ou froide, afin d'obtenir une intensité lumineuse comprise entre 85 et 135 $\mu E\ m^{-2} \cdot s^{-1}$ lorsqu'elle est mesurée dans le domaine de longueur d'onde autorisant la photosynthèse (400 à 700 nm) à des points situés à la même distance de la source lumineuse que les thalles de *Lemna* (équivalant à 6 500-10 000 lux). Tout écart à l'intensité lumineuse choisie ne doit pas dépasser ± 15 % dans la zone de l'essai. La méthode de détection et de mesure de la lumière, notamment le type de capteur, affectera la valeur mesurée. Les capteurs

▼M6

sphériques (qui détectent la lumière provenant de tous les angles situés au-dessus et en dessous du plan de mesure) et les capteurs «cosinus» (qui détectent la lumière provenant de tous les angles situés au-dessus du plan de mesure) sont préférables aux capteurs unidirectionnels et afficheront des valeurs plus élevées pour une source lumineuse multiple comme celle qui est décrite ici.

36. La température des récipients d'essai est maintenue à 24 ± 2 °C. Le pH du milieu témoin ne peut augmenter de plus de 1,5 unité au cours de l'essai. Toutefois, un écart supérieur à 1,5 unité n'invalidera pas l'essai, si le respect des critères de validité peut être démontré.Il faudra être particulièrement attentif aux variations du pH dans certains cas particuliers, notamment avec des substances instables et des métaux. La référence (8) fournit des indications supplémentaires à ce sujet.

Durée

37. L'essai prend fin sept jours après le transfert des plantes dans les récipients expérimentaux.

Mesures et déterminations analytiques

38. Au début de l'essai, on dénombre les thalles présents dans les récipients d'essai et on consigne ces valeurs en prenant soin de compter les thalles émergeants bien visibles. Les nombres de thalles paraissant normaux ou anormaux sont déterminés au début de l'essai, au moins une fois tous les trois jours durant la période d'exposition (c'est-à-dire à au moins deux occasions au cours de la période de 7 jours) et à la fin de l'essai. Il y a lieu de noter les changements affectant le développement des plantes, par exemple en ce qui concerne la taille et l'aspect des thalles, les signes de nécrose, de chlorose ou les gibbosités, la fragmentation des colonies ou la diminution de leur flottabilité ainsi que la longueur et l'aspect des racines. Les caractéristiques significatives du milieu d'essai (par exemple, la présence de matières non dissoutes, le développement d'algues dans les récipients d'essai) doivent également être rapportées.

39. Durant l'essai, en plus de la détermination du nombre de thalles, on mesure aussi les effets de la substance chimique d'essai sur une ou plusieurs des variables suivantes:

i) superficie totale des thalles

ii) poids sec

iii) poids frais.

40. La superficie totale des thalles présente l'avantage de pouvoir être déterminée pour chaque récipient traité et témoin au début, pendant et à la fin de l'essai. Le poids sec ou frais est déterminé au début de l'essai à partir d'un échantillon de la culture de l'inoculum représentatif du matériel utilisé pour entamer l'essai et à la fin de l'essai avec le matériel végétal de chaque récipient traité et de chaque récipient témoin. Si la superficie des thalles n'est pas mesurée, le poids sec est préférable au poids frais.

41. La superficie totale des thalles, le poids sec et le poids frais peuvent être déterminés comme suit:

i) *Superficie totale des thalles:* La superficie totale des thalles de toutes les colonies peut être déterminée par analyse de l'image. On saisit la silhouette du récipient expérimental et des plantes avec une caméra vidéo (en plaçant le récipient sur une boîte lumineuse) et on numérise l'image obtenue. Un étalonnage réalisé avec des formes planes de superficie connue permet ensuite de déterminer la superficie totale des thalles dans un récipient d'essai. On veillera à éviter toute interférence avec le bord du récipient d'essai. Une autre méthode plus laborieuse consiste à photocopier les récipients d'essai contenant les plantes, à découper la silhouette résultante des colonies et à déterminer leur superficie à l'aide d'un analyseur de la surface foliaire ou de papier millimétré. D'autres techniques (par exemple le quotient du poids de la silhouette découpée dans le papier par le poids d'un morceau de papier de superficie connue) conviennent également.

▼**M6**

ii) *Poids sec:* Toutes les colonies sont prélevées dans chaque récipient d'essai et rincées avec de l'eau distillée ou désionisée. Elles sont déposées sur un buvard qui absorbe l'excès d'eau et séchées à 60 °C jusqu'à ce qu'elles atteignent un poids constant. Tous les fragments de racines doivent être inclus. Le poids sec doit être exprimé avec une précision d'au moins 0,1 mg.

iii) *Poids frais:* Toutes les colonies sont transférées dans des tubes de polystyrène (ou d'un autre matériau inerte) tarés et percés de petits trous (1 mm) dans leur fond arrondi. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3 000 tpm pendant 10 minutes à température ambiante. Les tubes contenant les colonies ainsi séchées sont repesés et le poids frais est calculé par déduction de la tare du tube.

Fréquence des mesures et des déterminations analytiques

42. Avec le procédé statique, le pH de chaque récipient traité doit être mesuré au début et à la fin de l'essai. Si le procédé est semi-statique, le pH est mesuré dans chaque lot de «nouvelle» solution expérimentale avant chaque renouvellement ainsi que dans les solutions «utilisées» correspondantes.

43. L'intensité lumineuse est mesurée dans l'enceinte de croissance, dans l'incubateur ou dans la pièce à des points situés à la même distance de la source de lumière que les thalles de *Lemna*, et ce au moins une fois au cours de l'essai. La température du milieu est mesurée au moins une fois par jour dans un récipient d'essai supplémentaire gardé dans les mêmes conditions que les autres dans l'enceinte de croissance, l'incubateur ou la pièce.

44. Durant l'essai, les concentrations de la substance chimique d'essai sont déterminées à intervalles appropriés. Dans les essais statiques, il faut déterminer les concentrations au moins au début et à la fin de l'essai.

45. Dans les essais semi-statiques, où l'on s'attend à ce que la concentration de la substance chimique d'essai ne reste pas dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale, il est nécessaire d'analyser toutes les solutions d'essai nouvellement préparées et les mêmes solutions à chaque renouvellement (voir paragraphe 33). Néanmoins, pour les essais où la concentration de la substance chimique d'essai mesurée initialement ne se situe pas dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale, mais où suffisamment d'indices attestent que les concentrations initiales sont répétables et stables (c'est-à-dire dans l'intervalle de 80 - 120 % de la concentration initiale), les analyses chimiques peuvent n'être effectuées qu'aux concentrations expérimentales maximale et minimale. Dans tous les cas, la détermination des concentrations de la substance chimique d'essai avant le renouvellement pourra n'être effectuée que dans un seul des récipients identiques de chaque concentration expérimentale (ou dans un récipient dans lequel on aura mélangé le contenu de tous les récipients traités de manière identique).

46. Un régime de prélèvement identique à celui décrit pour les essais semi-statiques pourra être appliqué aux essais dynamiques, avec une analyse au début, au milieu et à la fin de l'essai, mais sans l'analyse des solutions «utilisées» qui ne se justifie pas dans ce cas. Dans ce type d'essai, le débit du diluant et de la substance chimique d'essai ou de la solution mère de la substance chimique d'essai doit être contrôlé quotidiennement.

47. S'il s'avère que la concentration de la substance chimique d'essai a pu se maintenir dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale ou mesurée initialement tout au long de l'essai, l'analyse des résultats peut s'appuyer sur les valeurs nominales ou mesurées initialement. Si l'écart à la concentration nominale ou mesurée initialement est supérieur à ± 20 %, l'analyse des résultats devra reposer sur la moyenne géométrique de la concentration relevée durant l'exposition ou sur des modèles décrivant le déclin de la concentration de la substance chimique d'essai (8).

▼M6

Essai limite

48. Dans certaines circonstances, par exemple lorsqu'un essai préliminaire indique que la substance chimique d'essai n'exerce aucun effet toxique à des concentrations allant jusqu'à 100 mg/l ou à sa limite de solubilité dans le milieu d'essai (suivant celle qui est la plus basse), on peut conduire un essai limite afin de comparer les réactions d'un groupe témoin avec celles d'un groupe traité (à 100 mg/l ou à une concentration égale à la limite de solubilité). Il est fortement recommandé d'étayer cet essai par une analyse de la concentration d'exposition. Tous les critères de validité et conditions expérimentales décrits précédemment s'appliquent à l'essai limite, si ce n'est que le nombre de récipients traités de manière identique doit être doublé. La croissance des lentilles d'eau dans le groupe témoin et dans le groupe traité peut être analysée au moyen d'un test statistique permettant de comparer les moyennes, par exemple un test t de Student.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Temps de doublement

49. La formule suivante, appliquée avec les données provenant des récipients témoins, permet de déterminer le temps de doublement (T_d) du nombre de thalles et de vérifier si l'étude respecte ce critère de validité (paragraphe 12):

$$T_d = \ln 2/\mu$$

où μ est le taux de croissance spécifique moyen calculé suivant les indications des paragraphes 54 et 55.

Variables étudiées

50. Cet essai est destiné à déterminer les effets de la substance chimique d'essai sur la multiplication végétative de *Lemna*. La présente méthode d'essai décrit deux variables, de manière à répondre aux différentes préférences et exigences réglementaires de juridictions distinctes. Pour que les résultats de l'essai soient acceptables pour toutes les juridictions, les effets doivent être évalués en fonction des deux variables étudiées (a) et (b) définies ci-dessous.

a) *Taux de croissance spécifique moyen:* cette variable étudiée est calculée d'après les changements affectant, d'une part, les logarithmes du nombre de thalles et, d'autre part, des logarithmes d'un autre paramètre mesuré (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) en fonction du temps (exprimé en jours), chez les témoins et dans chaque groupe traité. Elle est quelquefois appelée «taux de croissance relatif» (12).

b) *Rendement:* cette variable étudiée est calculée d'après les changements du nombre de thalles et d'un autre paramètre mesuré (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) chez les témoins et dans chaque groupe traité, jusqu'à la fin de l'essai.

51. Notons que les valeurs de toxicité calculées avec ces deux variables étudiées ne sont pas comparables et qu'il faut tenir compte de cette différence lorsqu'on utilise les résultats de l'essai. Les valeurs de la CE_x basées sur le taux de croissance spécifique moyen (C_xE_r) seront généralement supérieures à celles basées sur le rendement (C_xE_r), si les conditions expérimentales de cette méthode d'essai sont appliquées, en raison du fondement mathématique de chacune de ces approches. Cette différence n'est due qu'au calcul mathématique, il ne s'agit pas d'une différence de sensibilité entre les deux variables étudiées. Le concept du taux de croissance spécifique moyen repose sur l'allure générale de la croissance exponentielle des lentilles d'eau dans des cultures non limitées, où la toxicité est estimée d'après les effets sur le taux de croissance, sans tenir compte du niveau absolu du taux de croissance spécifique du témoin, de la pente de la courbe concentration-effet, ni de la durée de l'essai. En revanche, les résultats basés sur la variable de rendement

▼M6

dépendent de toutes ces autres variables. La C_xE_r dépend du taux de croissance spécifique de l'espèce de lentille d'eau utilisée dans chaque essai et du taux de croissance maximum spécifique, susceptible de varier entre les espèces, voire entre différents clones. Cette variable ne doit pas être utilisée pour comparer la sensibilité de différentes espèces, voire de différents clones de lentilles d'eau. S'il est préférable, du point de vue scientifique, d'estimer la toxicité d'après le taux de croissance spécifique moyen, cette méthode d'essai inclut également l'estimation basée sur le rendement afin de satisfaire à la réglementation en vigueur dans certaines juridictions.

52. Les estimations de la toxicité doivent reposer sur le nombre de thalles ainsi que sur une autre variable mesurée (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais), certaines substances risquant d'avoir un effet bien plus prononcé sur une variable autre que le nombre de thalles, effet qui ne serait pas détecté par le seul calcul du nombre de thalles.

53. On dresse un tableau réunissant le nombre de thalles et toute autre variable mesurée (c'est-à-dire superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) ainsi que les concentrations de la substance chimique d'essai relevées à chaque mesure. Les analyses ultérieures, par exemple pour estimer la CMEO, la CSEO ou la CE_x, doivent s'appuyer sur les valeurs de chaque expérience identique d'un même essai et non sur les moyennes calculées pour chaque groupe traité.

Taux de croissance spécifique moyen

54. Le taux de croissance spécifique moyen durant une période donnée est calculé en fonction de l'accroissement logarithmique des variables de la croissance — nombre de thalles et une autre variable mesurée (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) — au moyen de la formule ci-dessous pour chaque expérience identique des groupes traités et témoins:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln (N_j) - \ln (N_i)}{t}$$

où:

— μ_{i-j}: est le taux de croissance spécifique moyen du temps i au temps j

— N_i: N est la variable mesurée dans le récipient témoin ou traité au temps i

— N_j est la variable mesurée dans le récipient témoin ou traité au temps j

— t est la période de temps comprise entre i et j

Pour chaque groupe traité et témoin, calculer un taux de croissance moyen et les estimations de la variance.

55. On calcule le taux de croissance spécifique moyen sur l'ensemble de la période d'essai (le temps «i» mentionné dans la formule ci-dessus correspond au début de l'essai et le temps «j» à la fin de l'essai). Pour chaque concentration des groupes traités et des témoins, calculer la valeur moyenne du taux de croissance spécifique ainsi que les estimations de la variance. Évaluer également le taux de croissance section par section, afin d'apprécier les effets de la substance chimique d'essai durant la période d'exposition (par exemple en analysant les courbes de croissance log-transformées). Un taux de croissance section par section sensiblement différent du taux de croissance moyen montre qu'il y a un écart par rapport à la croissance exponentielle constante, écart qui réclame un examen attentif des courbes de croissance. Dans ce cas, une approche prudente consisterait à comparer les taux de croissance spécifiques des cultures traitées durant la période d'inhibition maximale avec ceux des témoins au cours de la même période.

56. Le pourcentage d'inhibition du taux de croissance (I_r) peut ensuite être calculé pour chaque concentration expérimentale (groupe traité) selon la formule suivante:

▼M6

$$\%\ I_r = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} \times 100$$

où:

— % I_r: est le pourcentage d'inhibition du taux de croissance spécifique moyen

— μ_C: est la valeur moyenne de μ dans le groupe témoin

— μ_T: est la valeur moyenne de μ dans le groupe traité

Rendement

57. Les effets sur le rendement sont déterminés en fonction de deux variables mesurées: le nombre de thalles et une autre variable (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) mesurées dans chaque récipient d'essai au début et à la fin de l'essai. En ce qui concerne le poids frais ou sec, la biomasse de départ est déterminée à partir d'un échantillon de thalles prélevé dans le lot qui a servi à ensemencer les récipients d'essai (voir paragraphe 20). Pour chaque concentration expérimentale et le témoin, calculer un rendement moyen ainsi que les estimations de la variance. Le pourcentage moyen d'inhibition du rendement (% I_r) peut être calculé pour chaque groupe traité d'après la formule suivante:

$$\%\ I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

où:

— % I_y est le pourcentage de réduction du rendement

— b_C est la biomasse finale moins la biomasse de départ dans le groupe témoin

— b_T est la biomasse finale moins la biomasse de départ dans le groupe traité

Courbes concentration-effet

58. On trace des courbes concentration-effet décrivant le pourcentage d'inhibition moyen de la variable étudiée (I_t ou I_r calculées comme indiqué aux paragraphes 56 et 57) en fonction du logarithme de la concentration de la substance chimique d'essai.

Estimation de la CE_x

59. Les estimations de la CE_x (par exemple la CE_{50}) s'appuient à la fois sur le taux de croissance spécifique moyen (C_xE_r) et sur le rendement (C_xE_r), qui doivent, à leur tour, reposer sur le nombre de thalles et sur une variable mesurée supplémentaire (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) puisque certaines substances n'exercent pas le même effet sur le nombre de thalles que sur d'autres variables mesurées. Les paramètres de toxicité souhaités sont donc quatre valeurs de CE_x pour chaque niveau d'inhibition x calculé: C_xE_r (nombre de thalles); C_xE_t (superficie totale des thalles, poids sec ou frais); C_xE_r (nombre de thalles); et C_xE_r (superficie totale des thalles, poids sec ou frais).

Méthodes statistiques

60. L'objectif consiste à obtenir une relation quantitative concentration-effet par une analyse de la régression. Il est possible d'utiliser une régression linéaire pondérée après avoir effectué une transformation linéarisante des valeurs décrivant l'effet observé — par exemple dans des unités probit ou logit ou Weibull (13), mais il est préférable d'appliquer des méthodes de régression non linéaire, celles-ci traitant mieux les irrégularités inévitables des valeurs et les écarts par rapport aux distributions régulières. Proches de zéro ou de l'inhibition totale, ces irrégularités risquent d'être amplifiées par la transformation et d'interférer avec l'analyse (13). Notons que les méthodes d'analyse courantes faisant appel aux transformations probit, logit ou Weibull sont destinées à être utilisées avec des effets par tout ou rien (mortalité ou

▼M6

survie, par exemple) et doivent être modifiées pour pouvoir être utilisées avec les valeurs du taux de croissance ou du rendement. Les références (14)(15) et (16) décrivent des procédures permettant de déterminer les valeurs de la CE_x à partir de données continues.

61. Pour chaque variable étudiée à analyser, utiliser la relation concentration-effet pour calculer des estimations ponctuelles des valeurs de CE_x. Déterminer, si possible, les limites de confiance à 95 % pour chaque estimation. La validité de l'ajustement des données décrivant les effets au modèle de régression est à évaluer par un procédé statistique ou graphique. L'analyse de la régression doit s'appuyer sur les effets relevés dans chaque récipient traité de manière identique et non sur les moyennes des groupes traités.

62. Les estimations de la CE_{50} et les limites de confiance peuvent aussi être obtenues par interpolation linéaire avec bootstrap (rééchantillonnage) (17), si les modèles ou méthodes de régression disponibles ne conviennent pas aux données.

63. Afin d'estimer la CMEO, et par conséquent la CSEO, il est nécessaire de comparer les moyennes des groupes traités par une analyse de la variance (ANOVA). La moyenne de chaque concentration doit ensuite être comparée avec la moyenne du témoin à l'aide d'un test approprié à comparaisons multiples ou de tendance. Les essais de Dunnett ou de William peuvent être utiles (18)(19)(20)(21). Il est nécessaire de vérifier si l'hypothèse de l'ANOVA de l'homogénéité de la variance tient. Cette vérification peut être pratiquée par un procédé graphique ou par un test formel (22), notamment les tests de Levene ou de Bartlett. L'infirmation de l'hypothèse de l'homogénéité de la variance peut quelquefois être corrigée par une transformation logarithmique des données. Si l'hétérogénéité de la variance est extrême et ne peut être rectifiée par une transformation, on envisagera des méthodes d'analyse telles que les tests de tendance régressifs de Jonkheere. La référence (16) livre des renseignements supplémentaires sur la détermination de la CSEO.

64. Des découvertes récentes conduisent les scientifiques à préconiser d'abandonner la notion de CSEO et de la remplacer par des estimations ponctuelles de la CE_x fondées sur la régression. Aucune valeur appropriée de x n'a encore été établie pour cet essai sur les *Lemna*. Néanmoins, une gamme de 10 à 20 % semble convenir (suivant la variable étudiée sélectionnée) et il est préférable de mentionner à la fois la CE_{10} et la CE_{20} dans le rapport.

Rapport

65. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Substance chimique d'essai:

— état physique et propriétés physico-chimiques, notamment la limite de solubilité dans l'eau;

— données d'identification chimique (par exemple numéro CAS), y compris la pureté (impuretés).

Espèce soumise à l'essai:

— nom scientifique, clone (s'il est connu) et source.

Conditions expérimentales:

— procédé expérimental appliqué (statique, semi-statique ou dynamique);

— date du début de l'essai et durée de l'essai;

— milieu expérimental

— description de la conception de l'essai (récipients d'essai et couvercles, volumes des solutions, nombre de colonies et de thalles par récipient au début de l'essai);

— concentrations expérimentales (nominales et mesurées selon les besoins) et nombre d'expériences identiques par concentration;

▼**M6**

— méthodes de préparation des solutions mères et des solutions d'essai, y compris l'utilisation d'un solvant ou d'un dispersant le cas échéant;

— température appliquée durant l'essai;

— source, intensité et homogénéité lumineuses;

— valeurs du pH des milieux traités et des milieux témoins;

— concentrations de la substance chimique d'essai, méthode d'analyse et données permettant d'évaluer la qualité (études de validation, écarts-types ou limites de confiance des analyses);

— méthodes de détermination du nombre de thalles et des autres variables mesurées, par exemple le poids sec, le poids frais ou la superficie des thalles;

— tous les écarts par rapport à cette méthode d'essai.

Résultats:

— données brutes: nombre de thalles et autres variables mesurées dans chaque récipient traité et témoin à chaque observation et à chaque analyse;

— moyennes et écarts-types de chaque variable mesurée;

— courbes de croissance à chaque concentration (il est recommandé d'ajouter la transformation logarithmique de la variable mesurée, voir paragraphe 55);

— temps de doublement/taux de croissance chez le témoin d'après le nombre de thalles;

— calcul des variables étudiées pour chaque expérience identique à chaque concentration, avec valeurs moyennes et coefficient de variation des expériences identiques;

— représentation graphique de la relation concentration-effet;

— estimation des effets toxiques pour les variables étudiées, par exemple CE_{50}, CE_{20}, CE_{10} et intervalles de confiance associés. Si elles ont été calculées, la CMEO et/ou la CSEO ainsi que les méthodes statistiques utilisées pour les déterminer;

— si on a pratiqué une analyse de la variance, la puissance de l'effet détectable (par exemple, la différence la moins significative);

— toute stimulation de la croissance, le cas échéant, dans un groupe traité;

— tout signe visuel de phytotoxicité et observations des solutions d'essai;

— analyse des résultats, y compris l'influence d'un éventuel écart à cette Ligne directrice sur les résultats de l'essai.

BIBLIOGRAPHIE

(1) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test with *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

(2) US EPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EpA 712-C-96-156. 8 pages.

(3) AFNOR — Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 pages.

(4) Institut suédois de normalisation (SIS). (1995). Qualité de l'eau — Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*, lentille d'eau, sur sept jours. SS 02 82 13. 15 pages (en suédois)

▼M6

(5) Environment Canada. (1999). Méthode d'essai biologique: essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole, *Lemna minor* SPE 1/RM/37 — 131 pages

(6) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service (Service Canadien de la faune), Technical Report Series N° 145.

(7) Sims I., Whitehouse P. and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.

(8) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publications Hygiène et sécurité de l'environnement — Série sur les essais et l'évaluation N°.23. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(9) Organisation internationale de normalisation. ISO DIS 20079. Qualité de l'eau – Détermination de l'effet toxique des constituants de l'eau et des eaux résiduaires vis-à-vis des lentilles d'eau (*Lemna minor*) — Essai d'inhibition de la croissance des lentilles d'eau

(10) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. Septembre 1977.

(11) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353-359.

(12) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.

(13) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19, 713-718.

(14) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11, 157-167.

(15) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.

(16) OCDE. (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(17) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(18) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.

(19) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

(20) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(21) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 519-531.

(22) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96

▼M6

Appendice 1

Définitions

Les définitions et abréviations suivantes sont utilisées aux fins de la présente méthode d'essai:

Biomasse: poids sec de la matière vivante présente dans une population. Dans cet essai, la biomasse est mesurée indirectement, en général par le nombre de thalles et la superficie des thalles, si bien que le terme «biomasse» recouvre également ces paramètres.

Substance chimique: une substance ou un mélange

Chlorose: jaunissement du tissu des thalles.

Clone: organisme ou cellule issu d'un seul organisme par reproduction asexuée. D'où l'identité génétique entre les individus issus d'un même clone.

Colonie: agrégat de thalles mères et filles (généralement 2 à 4) attachés les uns aux autres. Quelquefois désignée par le terme «plante».

CE_x: concentration de la substance chimique d'essai dissoute dans le milieu d'essai entraînant une réduction de x % (par exemple 50 %) de la croissance de *Lemna* durant une période d'exposition définie (à mentionner explicitement si elle dépasse la durée normale ou totale de l'essai). Afin de distinguer les valeurs de la CE mesurées en fonction du taux de croissance de celles mesurées en fonction du rendement, on utilise les abréviations CE_t, s'agissant du taux de croissance, et CE_r, s'agissant du rendement, suivies par la mention de la variable utilisée, par exemple CE_t (nombre de thalles).

Dynamique: qualifie un essai dans lequel les solutions expérimentales sont renouvelées en continu.

Thalle: désigne l'appareil végétatif de la lentille d'eau réduit à une petite lame ovale individuelle. Il représente la plus petite unité (individu) capable de reproduction.

Gibbosité: bosse ou renflement apparaissant sur les thalles.

Croissance: augmentation de la variable mesurée, par exemple le nombre de thalles, le poids sec, le poids frais ou la superficie des thalles, au cours de l'essai.

Taux de croissance (taux de croissance spécifique moyen): accroissement logarithmique de la biomasse durant la période d'exposition.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): concentration d'essai la plus faible à laquelle on observe que la substance exerce un effet statistiquement significatif de réduction de croissance (à $p < 0,05$) par comparaison avec le témoin, durant une période d'exposition donnée. Néanmoins, toutes les concentrations supérieures à la CMEO doivent avoir un effet néfaste supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Lorsque ces deux conditions ne peuvent pas être remplies, il faut expliquer en détail la façon dont la CMEO (et donc la CSEO) a été choisie.

Variable mesurée: tout type de variable mesurée pour exprimer l'effet étudié au cours de l'essai par une ou plusieurs variables étudiées. Dans cette méthode, le nombre de thalles, la superficie des thalles, le poids frais et le poids sec sont des variables mesurées.

Monoculture: culture monospécifique.

Nécrose: tissu (des thalles) mort (c'est-à-dire blanc ou gorgé d'eau).

Concentration sans effet observé (CSEO): concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO.

Phénotype: caractéristiques observables d'un organisme déterminées par l'interaction de ses gènes avec l'environnement.

Variable étudiée: variable permettant d'estimer la toxicité à partir de n'importe quelle variable mesurée décrivant la biomasse, selon différentes méthodes de calcul. Dans cette méthode d'essai, les taux de croissance et le rendement représentent les variables étudiées déduites de variables mesurées, telles que le nombre de thalles, la superficie des thalles, le poids frais ou le poids sec.

▼**M6**

Essai semi-statique: essai dans lequel la solution d'essai est renouvelée périodiquement à intervalles définis durant l'essai.

Essai statique: essai sans renouvellement de la solution d'essai durant l'essai.

Substance chimique **d'essai**: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai

Effet étudié: décrit le facteur général qui sera modifié par rapport au témoin par la substance d'essai. Dans la présente méthode d'essai, l'effet étudié est l'inhibition de la croissance qui peut être exprimée par différentes variables étudiées déduites d'une ou plusieurs variables mesurées.

Milieu expérimental: milieu de croissance synthétique complet dans lequel les plantes mises à l'épreuve se développent pendant qu'elles sont exposées à la substance chimique d'essai. La substance chimique d'essai sera normalement dissoute dans le milieu expérimental.

Rendement: valeur de la variable mesurée choisie pour exprimer la biomasse à la fin de la période d'exposition moins la valeur de cette variable au début de la période d'exposition.

▼M6

Appendice 2

Description de *Lemma* spp.

La plante aquatique communément appelée «lentille d'eau», *Lemna* spp., appartient à la famille des Lemnaceae représentée par quatre genres répartis dans le monde. Leur taxonomie et leur aspect ont été décrits de façon complète (1)(2). *Lemna gibba* et *Lemna minor* sont des espèces représentées dans des zones tempérées et couramment utilisées dans les essais de toxicité. Ces deux espèces se caractérisent par une tige discoïde (thalle) flottante ou submergée, et une racine très fine partant du centre de la face inférieure de chaque thalle. *Lemna* spp. produisent rarement des fleurs et se reproduisent par voie végétative en engendrant de nouveaux thalles (3). Comparativement aux sujets âgés, les jeunes plantes ont tendance à être plus pâles, à avoir des racines plus courtes et à comporter deux ou trois thalles de différentes tailles. De par leur petite taille, leur structure simple, leur reproduction asexuée et la brièveté du temps séparant deux générations, les plantes du genre *Lemna* se prêtent remarquablement bien aux essais en laboratoire (4)(5).

La sensibilité étant susceptible de varier entre les espèces, seules les comparaisons de sensibilités intraspécifiques sont valables.

Exemples d'espèces de *Lemna* ayant servi à des essais: références bibliographiques des espèces

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotxicological bioassays. Licenciate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark, N.A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935-941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8 pages.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 pages.

Institut suédois de normalisation (SIS). (1995). Qualité de l'eau — Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*, lentille d'eau, sur sept jours. SS 02 82 13. 15 pages (en suédois)

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test with *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp 733-742.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EpA 712-C-96-156. 8 pages.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

Lemna perpusilla: Clark, J.R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). Ecotoxicol. Environ. Saf, 5:87-96.

Lemna trisulca: Huebert, D.B., Shay, J.M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481-483.

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Sources d'espèces de *Lemna*

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
Tél: + 1-416-978-3641
Fax: + 1-416-978-5878
e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca

▼**M6**

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
États-Unis
Tél.: 001 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
STOCKHOLM
SUÈDE
Tél.: +4686747240
Fax: +4686747636

Umweltbundesamt (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
Allemagne
e-mail: lemna@uba.de

BIBLIOGRAPHIE

(1) Hillman, W.S. (1961). The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221-287.

(2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.

(3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

(4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1-14.

(5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52 7-22.

▼**M6**

Appendice 3

Entretien d'une culture mère

Les cultures mères peuvent être conservées à basse température (4-10 °C) durant de longues périodes sans qu'il soit nécessaire de les rétablir. Le milieu de croissance des *Lemna* peut être identique à celui utilisé pour les essais, mais d'autres milieux riches en nutriments conviennent également aux cultures mères.

Régulièrement, plusieurs jeunes plantes vert clair sont prélevées et transférées aseptiquement dans de nouveaux récipients de culture contenant un milieu frais. Aux basses températures proposées ici, les sous-cultures peuvent être lancées à des intervalles allant jusqu'à trois mois.

Il convient d'utiliser des récipients de culture en verre stériles et chimiquement propres (lavés à l'acide) et d'employer des techniques de manipulation aseptiques. Si la culture mère est contaminée, par des algues ou des champignons par exemple, on prendra les mesures nécessaires pour éliminer les organismes contaminants. S'agissant des algues et de la plupart des autres organismes contaminants, une stérilisation en surface peut suffire. Pour ce faire, on prélève un échantillon des plantes contaminées et on leur coupe les racines. On agite ensuite les plantes vigoureusement dans de l'eau propre, avant de les immerger dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 % (v/v) durant 30 secondes à 5 minutes. Après quoi, on rince les plantes à l'eau stérile et on les transfère en plusieurs lots dans des récipients de culture contenant du milieu de croissance frais. Ce traitement détruit beaucoup de thalles, surtout si les périodes d'exposition sont plus longues, mais certaines des plantes survivantes ne sont généralement plus contaminées. Celles-ci peuvent alors être utilisées pour ensemencer de nouvelles cultures.

▼**M6**

Appendice 4

Milieux

Différents milieux de croissance sont recommandés pour *L. minor* et *L. gibba*, à savoir une version modifiée du milieu établi par l'Institut suédois de normalisation (SIS) pour *L. minor*, et le milieu 20X AAP pour *L. gibba*. Ces deux milieux, dont les compositions sont données ci-dessous, doivent être préparés avec des réactifs et des produits de qualité «réactif ou pour analyse» et de l'eau désionisée.

Milieu de croissance pour *Lemna* établi d'après celui de l'Institut suédois de normalisation

— Les solutions mères I - V sont stérilisées à l'autoclave (120 °C, 15 minutes) ou par filtration sur une membrane (à pores d'environ 0,2 μm).

— La solution mère VI (et, si on le souhaite, la solution mère VII) ne sont stérilisées que par filtration sur membrane; elles ne doivent pas être autoclavées.

— Les solutions mères stériles doivent être entreposées au frais et à l'obscurité. Les solutions mères I - V doivent être éliminées après six mois, tandis que la solution mère VI et, le cas échéant, la solution mère VII, sont périmées après 1 mois.

Solution mère n°	Substance	Concentration dans la solution mère (g/l)	Concentration dans le milieu préparé (mg/•l)	Milieu préparé	
				Élément	Concentration (mg/•l)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO_4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA $\cdot 2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (tampon)	490	490	—	—

Pour préparer un litre de milieu SIS, ajouter les ingrédients suivants à 900 ml d'eau désionisée:

▼M6

— 10 ml de solution mère I

— 5 ml de solution mère II

— 5 ml de solution mère III

— 5 ml de solution mère IV

— 1 ml de solution mère V

— 5 ml de solution mère VI

— 1 ml de solution mère VII (facultatif)

Note: la solution mère VII (tampon MOPS) peut être nécessaire pour certaines substances chimiques d'essai (voir au paragraphe 11).

Le pH est ajusté à 6,5 ± 0,2 avec du HCl ou du NaOH 0,1 ou 1 M, et le volume est porté à un litre avec de l'eau désionisée.

Milieu de croissance 20X AAP

Les solutions mères sont préparées dans de l'eau stérile distillée ou désionisée.

Les solutions mères stériles doivent être entreposées au frais et à l'obscurité. Dans ces conditions, les solutions mères se conservent au moins 6 à 8 semaines.

Cinq solutions mères nutritives (A1, A2, A3, B et C) sont préparées pour le milieu 20X AAP, avec des produits de qualité «réactif». Le milieu de croissance se compose de 20 ml de chaque solution mère nutritive ajoutés à environ 850 ml d'eau désionisée. Le pH est ajusté à 7,5 ± 0,1 avec du HCl ou du NaOH 0,1 ou 1 M, et le volume est porté à un litre avec de l'eau désionisée. Le milieu est ensuite filtré sur une membrane à pores d'environ 0,2 μm dans un récipient stérile.

Le milieu de croissance destiné aux essais doit être préparé 1 à 2 jours avant son utilisation pour que le pH ait le temps de se stabiliser. On vérifie le pH du milieu de croissance avant utilisation et on le rajuste si nécessaire par l'ajout d'une solution de HCl ou de NaOH 0,1 ou 1 M, comme décrit ci-dessus.

Solution mère n°	Substance	Concentration dans la solution mère (g/•l) (*)	Concentration dans le milieu préparé (mg/•l) (*)	Milieu préparé	
				Élément	Concentration (mg/•l) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na;N	190;84
	$MgCl_2$ $6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,4	30	K;P	9,4;3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66

▼**M6**

Solution mère n°	Substance	Concentration dans la solution mère (g/•l) (*)	Concentration dans le milieu préparé (mg/•l) (*)	Milieu préparé	
				Élément	Concentration (mg/•l) (*)
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	$NaHCO_3$	15	300	Na;C	220 43

(*) sauf mention contraire

Note: la concentration finale de bicarbonate théoriquement appropriée (permettant d'éviter un ajustement appréciable du pH) est de 15 mg/l et non de 300 mg/l. Toutefois, le milieu 20X-AAP a jusqu'à présent été utilisé avec une concentration de 300 mg/l de bicarbonate, y compris dans l'essai tournant conduit pourcette méthode d'essai [I. Sims, P. Whitehouse et R. Lacey (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency].

Milieu de STEINBERG (d'après la norme ISO 20079)

Concentrations et solutions mères

Dans la norme ISO 20079, le milieu modifié de Steinberg n'est utilisé que pour *Lemna minor* (puisque seule *Lemna minor* est autorisée dans les essais relevant de cette norme), mais des essais ont montré que *Lemna gibba* pouvait également donner de bons résultats.

Ce milieu doit être préparé avec des produits de qualité «réactif» ou «pour analyse» et de l'eau désionisée.

Préparer le milieu nutritif à partir de solutions mères ou du milieu dix fois plus concentré (permettant d'atteindre une concentration maximale sans précipitation).

Tableau 1

milieu de STEINBERG À pH stabilisé (modifié par Altenburger)

Constituant		Milieu nutritif	
Macroéléments	poids molaire	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41

▼**M6**

Constituant		Milieu nutritif	
Microéléments	poids molaire	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA dihydrate de sodium	372,24	1 500,00.	4,03

Tableau 2

Solutions mères (macroéléments)

1. Macroéléments (concentrés 50 fois)	**g/l**
Solution mère 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Solution mère 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Solution mère 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Tableau 3

Solutions mères (microéléments)

2. Microéléments (concentrés 1 000 fois)	**mg/l**
Solution mère 4:	
H_3BO_3	120,0
Solution mère 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Solution mère 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Solution mère 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Solution mère 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA dihydrate de sodium	1 500,00.

— Les solutions mères 2 et 3 peuvent être réunies, de même que les solutions mères 4 et 7 (en tenant compte des concentrations requises).

▼**M6**

— Pour augmenter la durée de conservation des solutions mères, stériliser celles-ci en les laissant 20 minutes dans l'autoclave à 121 °C ou en les filtrant de manière stérile sur une membrane à pores de 0,2 μm. La stérilisation par filtration (0,2 μm) est fortement recommandée pour la solution mère 8.

Préparation du milieu de STEINBERG (modifié) à la concentration finale

— Ajouter 20 ml des solutions mères 1, 2 et 3 (voir tableau 2) à environ 900 ml d'eau désionisée afin d'éviter une précipitation.

— Ajouter 1,0 ml des solutions mères 4, 5, 6, 7 et 8 (voir tableau 3).

— Le pH doit être à 5,5 ± 0,2 (ajuster par ajout d'un volume minime de solution de NaOH ou de HCl).

— Porter à 1 000 ml avec de l'eau.

— Si les solutions mères sont stérilisées et qu'on utilise une eau appropriée, aucune stérilisation supplémentaire n'est nécessaire. Si le milieu final est stérilisé, la solution mère 8 doit être ajoutée après l'autoclavage (à 121 °C pendant 20 minutes).

Préparation du milieu de STEINBERG (modifié) concentré 10 fois pour stockage intermédiaire

— Ajouter 20 ml des solutions mères 1, 2 et 3 (voir tableau 2) à environ 30 ml d'eau afin d'éviter une précipitation.

— Ajouter 1,0 ml des solutions mères 4, 5, 6, 7 et 8 (voir tableau 3). Porter à 100 ml avec de l'eau.

— Si les solutions mères sont stérilisées et qu'on utilise une eau appropriée, aucune stérilisation supplémentaire n'est nécessaire. Si le milieu final est stérilisé, la solution mère 8 doit être ajoutée après l'autoclavage (à 121 °C pendant 20 minutes).

— Le pH du milieu (concentration finale) doit être à 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27 ESSAI DE TOXICITÉ SUR LES CHIRONOMES DANS UN SYSTÉME EAU-SÉDIMENT DOPÉ

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 218 (2004) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Cette méthode d'essai est conçue pour évaluer les effets d'une exposition prolongée à des substances chimiques sur des larves de *Chironomus* sp., un diptère vivant dans les sédiments d'eau douce. Elle s'appuie sur des protocoles d'essais de toxicité sur *Chironomus riparius* et *Chironomus tentans*, mis au point en Europe (1) (2) (3) et en Amérique du Nord (4) (5) (6) (7) (8), et soumis à des essais circulaires (1) (6) (9). D'autres espèces de chironomes bien documentées peuvent aussi être employées, par exemple *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).

2. Le scénario d'exposition appliqué dans cette méthode d'essai consiste à introduire la substance d'essai dans le sédiment. La sélection du mode d'exposition dépend de la finalité de l'essai. Le dopage du sédiment vise à simuler l'accumulation de produits chimiques persistants dans le sédiment. Ce chargement s'effectue dans un système expérimental eau-sédiment.

3. En général, les substances à tester sur des organismes vivant dans les sédiments subsistent longtemps dans ce compartiment. Ces organismes peuvent être exposés par diverses voies. L'importance relative de chaque voie d'exposition et le temps pris par chacune d'entre elles pour contribuer à l'effet toxique global dépendent des propriétés physico-chimiques de chaque substance chimique. Dans le cas des substances fortement adsorbantes (par exemple avec un log K_{oe}> 5) ou des substances liées de façon covalente au sédiment, l'ingestion d'aliments contaminés peut constituer une voie d'exposition non négligeable. Afin de ne pas sous-estimer la toxicité des substances fortement lipophiles, on envisagera d'ajouter de la nourriture au sédiment avant l'application de la substance d'essai. La présente méthode d'essai est axée sur l'exposition à long terme, de façon à couvrir toutes les voies d'exposition potentielles. L'essai dure de 20 à 28 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* et de 28 à 65 jours pour *C. tentans*. Si l'on a besoin de données à court terme pour un motif précis, par exemple pour étudier les effets d'une substance chimique instable, des récipients supplémentaires, ajoutés au dispositif expérimental, peuvent être retirés après 10 jours d'essai.

4. Les effets observés sont le nombre total d'adultes émergés et temps écoulé jusqu'à l'émergence. Si l'on a besoin de données à court terme, il est recommandé de ne mesurer la survie et la croissance des larves qu'après 10 jours, en ajoutant le nombre nécessaire de récipients supplémentaires.

5. L'utilisation d'un sédiment reconstitué est recommandée en raison de ses avantages par rapport aux sédiments naturels:

   — la variabilité expérimentale est réduite parce que le sédiment reconstitué forme une «matrice normalisée» reproductible; en outre, il n'est plus nécessaire de trouver des sources de sédiments non contaminés et non pollués,

   — les essais peuvent être effectués à n'importe quel moment de l'année, la variabilité saisonnière n'intervenant plus, et il n'est pas nécessaire de traiter préalablement le sédiment afin d'éliminer la faune indigène; l'utilisation de sédiments reconstitués diminue aussi le coût associé à la collecte sur le terrain d'une quantité suffisante de sédiments pour les essais systématiques,

   — les sédiments reconstitués permettent de comparer la toxicité des substances et de les classer en conséquence.

6. L'appendice 1 contient les définitions employées dans la présente méthode d'essai.

▼M4

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. Des chironomes au premier stade larvaire sont exposés à une gamme de concentrations de la substance d'essai dans un système sédiment-eau. Une fois la substance d'essai incorporée au sédiment, des larves au premier stade sont introduites dans des béchers où les concentrations d'eau et de sédiment ont été stabilisées. L'émergence des chironomes et leur vitesse de développement sont mesurées à la fin de l'essai. La survie des larves et leur poids peuvent aussi être mesurés après 10 jours si nécessaire (en ajoutant le nombre d'expériences identiques requis). Ces données sont analysées, soit à l'aide d'un modèle de régression pour estimer la concentration qui entraînerait une réduction de x % de l'émergence ou de la survie des larves ou de leur croissance (par exemple CE_{15}, CE_{50}, etc.), soit par la vérification d'une hypothèse statistique afin de déterminer une CSEO/CMEO. Cette dernière nécessite une comparaison entre les valeurs efficaces et les valeurs des témoins à l'aide de tests statistiques.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

8. Il faudrait connaître l'hydrosolubilité de la substance d'essai, sa pression de vapeur, son coefficient de partage mesuré ou calculé dans le sédiment et sa stabilité dans l'eau et le sédiment. Il convient de disposer d'une méthode d'analyse fiable pour quantifier la substance d'essai dans l'eau sus-jacente, dans l'eau des pores et dans le sédiment, et pour laquelle la précision et le seuil de détection sont connus. Il est également utile de connaître la formule structurale et la pureté de la substance d'essai ainsi que son devenir chimique (par exemple sa dissipation, sa dégradation abiotique et biotique, etc.). Des indications complémentaires pour tester les substances se prêtant difficilement à l'essai en raison de leurs propriétés physico-chimiques sont fournies à la référence (12).

SUBSTANCES CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE

9. Des substances de référence pourront être testées régulièrement afin de démontrer, la fiabilité du protocole et des conditions de l'essai. Voici quelques exemples de toxiques de référence ayant fait leurs preuves dans des essais circulaires et des études de validation: lindane, trifluraline, pentachlorophénol, chlorure de cadmium et chlorure de potassium (1) (2) (5) (6) (13).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

10. Pour que l'essai soit valide, les conditions suivantes doivent être remplies:

— l'émergence chez les témoins doit atteindre au moins 70 % à la fin de l'essai (1) (6),

— s'agissant de *C. riparius* et C. *yoshimatsui*, l'émergence au stade adulte dans les récipients témoins doit avoir lieu entre 12 et 23 jours après leur introduction dans les récipients expérimentaux; *C. tentans* nécessite une période de 20 à 65 jours,

— à la fin de l'essai, le pH et la concentration d'oxygène dissous seront mesurés dans chaque récipient. La concentration d'oxygène devrait atteindre au moins 60 % de la valeur de saturation en air (VSA) à la température appliquée et le pH de l'eau sus-jacente devrait être compris entre 6 et 9 dans tous les récipients expérimentaux,

— la température de l'eau ne devrait pas varier de plus de ± 1,0 °C et pourrait être contrôlée grâce à une chambre isotherme, auquel cas la température de la chambre devra être confirmée à intervalles appropriés.

▼M4

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Récipients expérimentaux

11. L'essai se déroule dans des béchers en verre de 600 ml, mesurant 8 cm de diamètre. D'autres récipients peuvent être utilisés à condition qu'ils permettent de garantir une profondeur adéquate d'eau et de sédiment. Le sédiment doit offrir une superficie de 2 à 3 cm^2 par larve. Le quotient de la profondeur de la couche de sédiment par la profondeur de la couche d'eau sus-jacente doit être égal à 1/4. Les récipients et les autres appareils qui entreront en contact avec le système d'essai doivent être composés uniquement de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte (par exemple du Téflon).

Sélection des espèces

12. *Chironomus riparius* est l'espèce qui convient le mieux. *Chironomus tentans* peut aussi être utilisé, mais il est plus difficile à manipuler et nécessite une période d'essai plus longue. *Chironomus yoshimatsui* convient également. La méthode de culture de *Chironomus riparius* est détaillée à l'appendice 2. D'autres documents décrivent les conditions de culture des autres espèces: *Chironomus tentans* (4) et *Chironomus yoshimatsui* (11). L'identification de l'espèce est à confirmer avant l'essai, mais n'est pas requise avant chaque essai si les organismes proviennent d'un élevage interne.

Sédiment

13. Il est préférable d'employer un sédiment reconstitué (également dénommé sédiment artificiel ou synthétique). Néanmoins, si l'on opte pour un sédiment naturel, il faudrait le caractériser, au moins quant au pH et à la teneur en carbone organique, (la détermination d'autres paramètres, tels que le rapport C/N et la granulométrie est aussi recommandée) et s'assurer qu'il n'est pas contaminé et n'abrite pas d'autres organismes qui pourraient entrer en compétition avec les chironomes ou les consommer. Avant d'utiliser un sédiment naturel dans un essai de toxicité sur les chironomes, il est également recommandé de le maintenir durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui seront appliquées durant l'essai (conditionnement). Le sédiment reconstitué décrit ci-dessous, basé sur le sol artificiel utilisé dans la méthode d'essai C.8, est recommandé (14) (1) (15) (16):

a) 4-5 % (poids sec) de tourbe, avec un pH aussi proche que possible de 5,5 à 6,0; il est important d'utiliser une tourbe sous forme de poudre, finement broyée (dimension des particules ≤ 1 mm) et séchée uniquement à l'air;

b) 20 % (poids sec) d'argile kaolinique (teneur en kaolinite de préférence supérieure à 30 %);

c) 75-76 % (poids sec) de sable quartzique (composé en majorité de sable fin, plus de 50 % des particules mesurant entre 50 et 200 μm);

d) ajouter de l'eau désionisée jusqu'à ce que la teneur en humidité du mélange final atteigne 30 à 50 %;

e) ajouter du carbonate de calcium de qualité chimiquement pure ($CaCO_3$) pour ajuster le pH du mélange final composant le sédiment à 7,0 ± 0,5. Il convient d'obtenir 2 % (± 0,5 %) de carbone organique dans le mélange final en y ajoutant les quantités appropriées de tourbe et de sable, comme indiqué en a) et en c).

14. Les sources de tourbe, de kaolin et de sable doivent être connues. On vérifiera que les composants du sédiment ne sont pas contaminés par des substances chimiques (par exemple des métaux lourds, des composés organochlorés, des composés organophosphorés, etc.). Un exemple de préparation de sédiment reconstitué est décrit à l'appendice 3. Les composants peuvent aussi être mélangés à l'état sec, à condition de démontrer qu'après l'ajout de l'eau sus-jacente, les composants du sédiment ne se séparent pas (flottement de particules de tourbe, par exemple) et que la tourbe ou le sédiment sont suffisamment conditionnés.

▼M4

Eau

15. Toute eau conforme aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable selon les critères spécifiés aux appendices 2 et 4 peut servir à l'essai. Toute eau appropriée, naturelle (eau superficielle ou souterraine), reconstituée (voir appendice 2) ou eau du robinet déchlorée, est acceptable comme eau pour l'élevage et les essais si les chironomes y survivent sur toute la durée de l'élevage et de l'essai sans manifester de signes de stress. Au début de l'essai, le pH de l'eau d'essai se situera entre 6 et 9 et sa dureté totale ne dépassera pas 400 mg/l en $CaCO_3$. Néanmoins, si l'on suspecte une interaction entre les ions qui provoquent la dureté et la substance d'essai, il faudra utiliser une eau moins dure (et ne pas employer le milieu Elendt M4 dans ce cas). Le même type d'eau doit être utilisé tout au long de l'étude. Les caractéristiques de la qualité de l'eau énumérées à l'appendice 4 sont à mesurer au moins deux fois par an ou chaque fois que ses caractéristiques sont susceptibles d'avoir été significativement modifiées.

Solutions mères – sédiments dopés

16. Les sédiments dopés sont généralement préparés à la concentration souhaitée en ajoutant directement une solution de la substance d'essai au sédiment. Une solution mère de la substance d'essai dissoute dans de l'eau désionisée est mélangée au sédiment reconstitué à l'aide d'un agitateur à rouleaux, d'un mélangeur pour aliments ou mélangée à la main. Si la substance d'essai est peu soluble dans l'eau, elle peut être dissoute dans un volume aussi petit que possible d'un solvant organique adéquat (hexane, acétone ou chloroforme, par exemple). Cette solution est ensuite mélangée à 10 g de sable quartzique fin par récipient d'essai. Il faut attendre que le solvant s'évapore jusqu'à ce qu'il soit totalement éliminé du sable; le sable est ensuite mélangé avec la quantité appropriée de sédiment par bécher. Seuls des agents très volatils peuvent être utilisés pour solubiliser, disperser ou émulsifier la substance d'essai. On n'oubliera pas de tenir compte de la quantité de sable apportée avec le mélange de la substance d'essai et du sable lors de la préparation du sédiment (ce dernier sera préparé avec moins de sable). Il faudra veiller à mélanger complètement la substance d'essai au sédiment et à l'y répartir uniformément. Si nécessaire, on analysera des sous-échantillons afin de déterminer le degré d'homogénéité.

CONCEPTION DE L'ESSAI

17. La conception de l'essai définit le nombre et l'espacement des concentrations expérimentales, le nombre de récipients à chaque concentration et le nombre de larves par récipient. La marche à suivre pour estimer une valeur de CE, la CSEO et mener un essai limite est décrite.

Conduite d'une analyse de régression

18. La concentration efficace (par exemple, CE_{15}, CE_{50}) et la gamme de concentrations dans laquelle l'effet produit par la substance d'essai est d'intérêt doivent être couvertes par les concentrations incluses dans l'essai. Généralement, l'exactitude, et plus particulièrement la validité, de l'estimation des concentrations efficaces (CE_x) s'accroissent lorsque la concentration efficace se situe dans la gamme des concentrations testées. Il faut éviter d'extrapoler des résultats très en dessous de la concentration efficace la plus faible ou au-dessus de la concentration maximale. Il est utile de conduire un essai préliminaire pour déterminer la gamme des concentrations à utiliser (voir paragraphe 27).

▼M4

19. S'il faut estimer la CE_x, au moins cinq concentrations et trois répétitions par concentration doivent être mises à l'essai. En tout état de cause, il est recommandé de tester suffisamment de concentrations pour obtenir une bonne estimation du modèle. Le facteur séparant les concentrations ne doit pas excéder deux (sauf dans les cas où la courbe dose-effet présente une pente faible). Le nombre de répétitions par traitement peut être diminué si le nombre de concentrations expérimentales entraînant différents effets est augmenté. L'augmentation du nombre de répétitions ou la contraction des intervalles entre les concentrations expérimentales tend à réduire les intervalles de confiance pour l'essai. Le nombre de répétitions sera augmenté s'il y a lieu d'estimer le taux de survie et la croissance des larves après dix jours.

Procédure d'estimation d'une CSEO/CMEO

20. S'il faut estimer la CMEO ou la CSEO, il convient de tester cinq concentrations expérimentales et au moins quatre répétitions par concentration, le facteur séparant les concentrations n'excédant pas deux. Le nombre d'expériences identiques doit être tel qu'il fournit une puissance statistique permettant de détecter une différence de 20 % avec le témoin, au seuil de signification statistique de 5 % (p = 0,05). S'agissant de la vitesse de développement, une analyse de la variance (ANOVA) convient généralement, telle que le test de Dunnett ou le test de Williams (17) (18) (19) (20). S'agissant du taux d'émergence, le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction selon Bonferroni) ou le test de Mantel-Haenszel peuvent être utilisés.

Essai limite

21. Si l'essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations n'a engendré aucun effet, un essai limite peut être conduit (une concentration expérimentale et un témoin). L'essai limite se pratique avec une concentration suffisamment élevée pour permettre aux décideurs d'exclure tout effet toxique possible de la substance d'essai et la limite est fixée à une concentration censée ne jamais être atteinte dans les conditions réelles. Une concentration de 1 000 mg/kg (poids sec) est recommandée. Il est généralement nécessaire de mener au moins six répétitions pour les organismes traités et les témoins. Il y a lieu de démontrer que la puissance statistique est suffisante pour détecter une différence de 20 % avec les témoins, au seuil de signification statistique de 5 % (p = 0,05). En ce qui concerne l'effet sur la vitesse de développement et sur le poids, le test t constitue une méthode statistique appropriée, si les données respectent les conditions exigées par ce test (normalité, variances homogènes). On pourra recourir au test t à variance inégale ou à un test non paramétrique, tel que le test de Wilcoxon-Mann-Whitney si ces conditions ne sont pas remplies. S'agissant du taux d'émergence, le test exact de Fisher convient.

MODE OPÉRATOIRE

Conditions d'exposition

Préparation du système sédiment dopé – eau

22. La procédure de mélange de la substance d'essai au sédiment décrite dans la méthode d'essai C.8, Toxicité pour les vers de terre, est recommandée pour cet essai (14). Les sédiments dopés sont placés au fond des récipients avant d'y verser l'eau, de façon à obtenir un ratio volumique sédiment-eau de 1/4 (voir paragraphes 11 et 15). La profondeur de la couche de sédiment doit être comprise entre 1,5 et 3 cm. Afin d'éviter la séparation des constituants du sédiment et la resuspension des particules fines pendant le remplissage de la colonne d'eau, on peut recouvrir le sédiment d'un disque en plastique durant cette opération et retirer le disque juste après. D'autres dispositifs conviennent également.

23. Les récipients expérimentaux doivent être couverts (par des plaques de verre, par exemple). On prendra soin de remplacer les volumes d'eau évaporée durant l'étude, le cas échéant, et ce avec de l'eau distillée ou désionisée afin d'empêcher l'accumulation de sels.

▼M4

Stabilisation

24. Une fois que le sédiment dopé surmonté d'une couche d'eau a été préparé, il est souhaitable de laisser la substance d'essai se répartir entre la phase aqueuse et le sédiment (3) (4) (6) (13), et ce, de préférence, dans les mêmes conditions de température et d'aération que durant l'essai. L'équilibre met de quelques heures à quelques jours à s'établir, voire 4-5 semaines dans de rares cas, selon le sédiment et la substance chimique. Il ne faut pas attendre que l'équilibre soit atteint, car beaucoup de substances risquent de se dégrader durant cette période, mais un temps d'attente de 48 heures est recommandé. Au terme de cette période d'équilibrage, on mesure la concentration de la substance d'essai dans l'eau sus-jacente, les pores et le sédiment, au moins pour la concentration la plus élevée et la plus faible (voir paragraphe 38). Ces déterminations analytiques de la substance d'essai permettent de calculer le bilan massique et d'exprimer les résultats en fonction des concentrations mesurées.

Introduction des organismes d'essai

25. Quatre à cinq jours avant d'introduire les organismes d'essai dans les récipients, des amas d'œufs sont prélevés dans les cultures et déposés dans de petits flacons contenant du milieu de culture. Un milieu plus ancien issu de la culture mère tout comme un milieu fraîchement préparé peuvent être utilisés. Si ce dernier est utilisé, on ajoutera une petite quantité de nourriture, par exemple des algues vertes et/ou quelques gouttes du filtrat d'une suspension de paillettes pour poissons finement broyées, au milieu de culture (voir appendice 2). Seuls des amas d'œufs fraîchement pondus peuvent être utilisés. Normalement, les larves commencent à éclore quelques jours après la ponte (2 à 3 jours pour *Chironomus riparius* à 20 °C et 1 à 4 jours pour *Chironomus tentans* à 23 °C et *Chironomus yoshimatsui* à 25 °C) et le développement des larves se déroule en quatre stades, dont chacun dure 4 à 8 jours. Cet essai se pratique au premier stade larvaire (2-3 ou 1-4 jours après l'éclosion). Il est possible de vérifier le stade de développement des moucherons d'après la largeur de la capsule céphalique (6).

26. Vingt larves au premier stade, choisies au hasard, sont déposées dans chaque récipient contenant le sédiment dopé et l'eau, à l'aide d'une pipette émoussée. L'aération de l'eau doit être interrompue dès qu'on introduit les larves dans les récipients expérimentaux, et ce durant 24 heures après l'ajout des larves (voir paragraphes 25 et 32). Selon le protocole expérimental suivi (voir paragraphes 19 et 20), le nombre de larves utilisées par concentration s'élève au moins à 60 pour l'estimation d'une valeur de concentration efficace (CE) et à 80 pour la détermination de la CSEO.

Concentrations d'essai

27. Il peut être utile de conduire un essai de détermination de l'ordre de grandeur pour délimiter la gamme de concentrations à appliquer dans l'essai proprement dit. À cet effet, on utilise une série de concentrations largement espacées de la substance d'essai. Afin de reproduire la même densité de surface par chironome que dans l'essai proprement dit, les chironomes sont exposés à chaque concentration de la substance d'essai durant une période permettant d'estimer les concentrations expérimentales appropriées et aucune expérience identique n'est nécessaire.

28. Les concentrations pour l'essai définitif sont choisies en fonction des résultats de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur. Au moins cinq concentrations doivent être appliquées et sélectionnées comme décrit aux paragraphes 18 à 20.

▼M4

Témoins

29. L'essai inclura le nombre nécessaire de récipients témoins pourvus du sédiment mais exempts de toute substance d'essai (voir paragraphes 19-20). Si la substance d'essai a été appliquée à l'aide d'un solvant (voir paragraphe 16), il convient d'ajouter un témoin dont le sédiment contient également le solvant.

Système expérimental

30. Des systèmes statiques sont utilisés. Des systèmes semi-statiques ou à écoulement continu avec renouvellement intermittent ou continu de l'eau sus-jacente peuvent être utilisés dans des cas exceptionnels, par exemple si les spécifications de la qualité de l'eau deviennent inappropriées pour l'organisme d'expérience ou affectent l'équilibre chimique (si, par exemple, la concentration d'oxygène dissous devient trop basse, la concentration des excréta augmente de façon trop importante ou si des minéraux lessivés à partir du sédiment affectent le pH et/ou la dureté de l'eau). Néanmoins, d'autres méthodes d'amélioration de la qualité de l'eau sus-jacente, telles que l'aération, seront normalement suffisantes et préférables.

Alimentation

31. Les larves ont besoin d'être nourries, de préférence quotidiennement TetraPhyll; ou au moins trois fois par semaine. Durant les dix premiers jours, chaque jeune larve recevra quotidiennement 0,25 à 0,5 mg (0,35-0,5 mg pour *C. yoshimatsui*) de nourriture pour poissons (suspendue dans l'eau ou finement moulue, par exemple TetraMin ou TetraPhyll; voir les détails à l'appendice 2). Il peut être nécessaire d'augmenter légèrement cette quantité pour les larves plus âgées: 0,5-1 mg par larve et par jour devrait suffire pour le reste de l'essai. On diminuera la ration alimentaire de tous les organismes traités et témoins si des champignons se développent ou si des organismes témoins meurent. Si la croissance fongique s'avère impossible à enrayer, l'essai doit être renouvelé. Si l'essai porte sur des substances fortement adsorbantes (par exemple avec un log K_{oe} > 5) ou des substances liées de façon covalente au sédiment, la quantité de nourriture nécessaire à la survie et à la croissance naturelle des organismes peut être ajoutée au sédiment reconstitué avant la période de stabilisation. Dans ce cas, la nourriture pour poissons est remplacée par une ration végétale, par exemple 0,5 % (poids sec) de feuilles finement broyées d'ortie (*Urtica dioica*), de mûrier (*Morus alba*), de trèfle blanc ou rampant (*Trifolium repens*), d'épinard (*Spinacia oleracea*), par exemple, ou d'un autre matériau végétal (*Cerophyl* ou alpha-cellulose).

Conditions d'incubation

32. L'eau sus-jacente est soumise à une légère aération, mise en route de préférence 24 heures après l'introduction des larves et maintenue jusqu'à la fin de l'essai (il faut veiller à ce que la concentration d'oxygène dissous ne tombe pas en dessous de 60 % de la valeur de saturation en air). L'air est insufflé à travers une pipette Pasteur en verre fixée 2 à 3 cm au-dessus de la couche de sédiment (une ou quelques bulles par seconde). Si la substance d'essai est volatile, il faudra éventuellement supprimer l'aération.

33. L'essai est mené à température constante (20 °C ± 2 °C). Pour *C. tentans* et *C. yoshimatsui*, les températures recommandées s'élèvent respectivement à 23 °C et 25 °C (± 2 °C). La photopériode est de 16 heures et l'éclairement compris entre 500 et 1 000 lux.

▼M4

Durée de l'exposition

34. L'exposition débute avec l'introduction des larves dans les récipients traités et témoins. La durée maximale de l'exposition s'élève à 28 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* et à 65 jours pour *C. tentans*. Si les moucherons émergent plus tôt, l'essai peut s'achever au moins cinq jours après l'émergence du dernier adulte témoin.

Observations

Émergence

35. La durée du développement et le nombre total de moucherons mâles et femelles adultes totalement émergés sont à déterminer. Les mâles sont faciles à identifier grâce à leurs antennes plumeuses.

36. Au moins trois fois par semaine, on vérifiera que les organismes des récipients expérimentaux ne manifestent aucun comportement anormal (sortie du sédiment, nage inhabituelle par exemple) par rapport aux témoins. Chaque jour, durant la période supposée de l'émergence, on comptera le nombre de moucherons émergés et on consignera le sexe et le nombre de moucherons complètement émergés. Après identification, les moucherons sont retirés des récipients. Tout amas d'œufs déposé avant la fin de l'essai doit être recensé puis enlevé afin d'empêcher la réintroduction de larves dans le sédiment. Le nombre de pupes visibles n'ayant pas réussi à émerger est aussi enregistré. Des indications sur la façon de mesurer l'émergence sont données à l'appendice 5.

Croissance et survie

37. S'il faut fournir des données sur la survie et la croissance des larves après 10 jours, des récipients d'essai supplémentaires seront ajoutés dès le début de l'essai, pour pouvoir être utilisés ultérieurement. Le sédiment de ces récipients supplémentaires sera tamisé à travers des mailles de 250 μm pour retenir les larves. La mort est déterminée par deux critères: l'immobilité et l'absence de réaction à un stimulus mécanique. Les larves non récupérées doivent aussi être comptabilisées parmi les mortes (les larves qui sont mortes au début de l'essai ont pu être dégradées par des microbes). Après avoir déterminé le poids sec (sans cendres) des larves survivantes par récipient expérimental, on calcule le poids sec individuel moyen par récipient. Il est utile d'établir à quel stade se trouvent les larves survivantes, et ce d'après la largeur de la capsule céphalique de chaque individu.

Mesures analytiques

Concentration de la substance d'essai

38. Avant le début de l'essai (c'est-à-dire avant l'introduction des larves), on prélève des échantillons du sédiment d'au moins un récipient par traitement, afin de déterminer analytiquement la concentration de la substance d'essai dans le sédiment. Il est recommandé d'analyser, au minimum, des échantillons de l'eau sus-jacente, de l'eau des pores, et du sédiment, au début (voir paragraphe 24) et à la fin de l'essai, et ce de la concentration la plus élevée et d'une concentration plus basse. Les concentrations de la substance d'essai nous renseignent sur le comportement et la répartition de la substance d'essai dans le système eau-sédiment.

39. Lorsqu'on effectue des mesures intermédiaires (par exemple au septième jour) et si l'analyse requiert des échantillons volumineux qui ne peuvent être prélevés des récipients sans influencer le système expérimental, les analyses seront pratiquées sur des échantillons provenant de récipients expérimentaux supplémentaires traités de la même façon (y compris par la présence des organismes d'essai), mais non utilisés pour des observations biologiques.

▼M4

40. Pour isoler l'eau interstitielle, on recommande de centrifuger les échantillons à 10 000 g et à 4 °C durant 30 minutes. Cependant, s'il est démontré que la substance d'essai ne s'adsorbe pas sur les filtres, la filtration est également acceptable. Avec des échantillons trop petits, il arrive que les concentrations dans l'eau des pores soient impossibles à analyser.

Paramètres physico-chimiques

41. Le pH de l'eau et la température des récipients d'essai doivent être mesurés de façon appropriée (voir paragraphe 10). La dureté de l'eau et la teneur en ammoniac sont mesurées dans les récipients témoins et dans un récipient traité à la concentration la plus élevée, au début et à la fin de l'essai.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

42. Cet essai vise à déterminer l'effet de la substance d'essai sur la vitesse de développement et le nombre total de moucherons mâles et femelles totalement émergés ou, dans le cas de l'essai de 10 jours, les effets sur la survie et le poids des larves. Si rien n'indique que les deux sexes présentent des différences statistiques de sensibilité, les résultats obtenus sur les mâles et les femelles peuvent être regroupés pour l'analyse statistique. Les différences de sensibilité entre les sexes peuvent être jugées statistiquement par un test (de tableau) χ^2 - r × 2, par exemple. La survie des larves et le poids sec individuel moyen par récipient doivent être déterminés après dix jours, le cas échéant.

43. Il est préférable de calculer les concentrations efficaces, exprimées en fonction du poids sec, à partir des concentrations mesurées dans le sédiment au début de l'essai (voir paragraphe 38).

44. Pour estimer ponctuellement la CE_{50} ou une quelconque CE_x, les statistiques par récipient peuvent être utilisées comme des expériences identiques proprement dites. Lorsqu'on calcule un intervalle de confiance pour une quelconque CE_x, il faut tenir compte de la variabilité entre les récipients ou montrer que celle-ci est négligeable. Si le modèle est ajusté par la méthode des moindres carrés, il convient d'appliquer une transformation des données pour les statistiques par récipient afin d'accroître l'homogénéité de la variance. Toutefois, les valeurs de la CE_x sont à calculer après que les résultats ont été «retransformés» de façon à recouvrer leur valeur originale.

45. Si l'analyse statistique vise à déterminer la CSEO/CMEO par la vérification d'une hypothèse, la variabilité entre les récipients doit être prise en compte, par exemple à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA) «emboîtée». Par contre, des tests plus robustes (21) peuvent être utilisés au cas où les hypothèses habituelles de l'analyse de la variance ne se vérifient pas.

Taux d'émergence

46. Le taux d'émergence donne une réponse par tout ou rien et peut être analysé par le test de Cochran-Armitage appliqué de façon régressive si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Dans le cas contraire, un test exact de Fisher ou un test de Mantel-Haenszel avec des valeurs de p corrigées selon Bonferroni-Holm peuvent être employés. S'il s'avère que la variabilité entre expériences identiques à la même concentration est supérieure à ce qu'une distribution binomiale indiquerait (variation souvent qualifiée d'«extra-binomiale»), on appliquera un test plus robuste (Cochran-Armitage ou test exact de Fisher) comme proposé à la référence (21).

▼**M4**

La somme des moucherons émergés par récipient, n_e, est déterminée et divisée par le nombre de larves introduites, n_a:

$$TE = \frac{n_e}{n_a}$$

où:

TE = taux d'émergence

n_e = nombre de moucherons émergés par récipient

n_a = nombre de larves introduites par récipient

47. Une variante plus appropriée aux échantillons de grande taille, lorsque la variance est extra-binomiale, consiste à traiter le taux d'émergence comme une réponse continue et à appliquer une méthode telle que le test de William si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Le test de Dunnett convient dans le cas où la relation ne s'avère pas monotone. Ici, on considère qu'un échantillon est de grande taille lorsque le nombre de moucherons émergés et le nombre de chironomes non émergés dépassent chacun cinq, par récipient expérimental.

48. Pour réaliser l'analyse de la variance (ANOVA), il convient d'appliquer aux valeurs de TE une transformation «arcsinus-racine carrée» ou «Freeman-Tukey» afin d'obtenir une distribution proche de la normale et d'égaliser les variances. Le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction de Bonferroni) ou le test de Mantel-Haenszel peuvent être employés lorsqu'on utilise des fréquences absolues. La transformation arcsinus-racine carrée consiste à calculer l'inverse du sinus ($sinus^{-1}$) de la racine carrée du TE.

49. Pour les taux d'émergence, les valeurs de la CE_x sont calculées par une analyse de régression [ou par probit (22), logit, Weibull, des logiciels commerciaux appropriés, etc.]. Si l'analyse de la régression échoue (par exemple, lorsqu'il y a moins de deux réponses partielles), on fait appel à d'autres méthodes non paramétriques telles que la moyenne mobile ou une simple interpolation.

Vitesse de développement

50. La période de développement moyenne représente le temps moyen écoulé entre l'introduction des larves (jour 0 de l'essai) et l'émergence de la cohorte expérimentale de moucherons (pour calculer la période de développement réelle, il faut tenir compte de l'âge des larves au moment de l'introduction). La vitesse de développement est l'inverse de la période de développement (unité: 1/jour) et représente la partie du développement larvaire qui s'effectue par jour. Pour évaluer la toxicité dans les sédiments, il est préférable de choisir la vitesse de développement, car sa variance est plus faible et ses valeurs sont plus homogènes et plus proches d'une distribution normale, en comparaison avec la période de développement. C'est pourquoi les tests paramétriques puissants conviennent mieux à la vitesse de développement qu'à la période de développement. Si la vitesse de développement est traitée comme une réponse continue, les valeurs de la CE_x peuvent être estimées par l'analyse de la régression, par exemple (23), (24).

51. Pour les tests statistiques suivants, le nombre de moucherons observés le jour × sont considérés comme ayant émergé au milieu de l'intervalle de temps compris entre le jour x et le jour x - 1 (1 = longueur de l'intervalle d'observation, habituellement 1 jour). La vitesse de développement moyenne par récipient (x) est calculée comme suit:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

où:

$\bar{x}$: vitesse de développement moyenne par récipient

i: indice de l'intervalle d'observation

m: nombre maximal d'intervalles d'observation

f_i: nombre de moucherons émergés durant l'intervalle d'observation i

n_e: nombre total de moucherons émergés à la fin de l'expérience ($=\sum f_i$)

x_i: vitesse de développement des moucherons émergés durant l'intervalle i

$$x_i = \frac{1}{\left(\text{jour}_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

où:

jour_i: jour d'observation (compté depuis l'application)

l_i: durée de l'intervalle d'observation I (exprimé en jours, habituellement 1 jour)

Rapport d'essai

52. Le rapport d'essai doit fournir au moins les informations suivantes:

Substance d'essai:

— état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (hydrosolubilité, pression de vapeur, coefficient de partage dans le sol (ou dans le sédiment s'il est connu), stabilité dans l'eau, etc.),

— identification chimique (nom courant, nom chimique, formule structurale, numéro CAS, etc.), pureté et méthode d'analyse pour la quantification de la substance d'essai.

Espèce d'essai:

— animal d'essai utilisé: espèce, nom scientifique, source et conditions d'élevage,

— informations sur la manipulation des amas d'œufs et des larves,

— âge des animaux d'expérience au moment où ils ont été déposés dans les récipients expérimentaux.

Conditions expérimentales:

— sédiment utilisé, c'est-à-dire naturel ou reconstitué,

— pour les sédiments naturels: localisation et description du site de prélèvement et notamment, si possible, son histoire en matière de contamination; caractéristiques: pH, teneur en carbone organique, quotient C/N et granulométrie, le cas échéant,

— préparation du sédiment reconstitué: ingrédients et caractéristiques (teneur en carbone organique, pH, humidité, etc. au début de l'essai),

— préparation de l'eau d'essai (si l'eau est reconstituée) et caractéristiques (concentration d'oxygène, pH, conductivité, dureté, etc. au début de l'essai),

— profondeur du sédiment et de l'eau sus-jacente,

— volume de l'eau sus-jacente et de l'eau des pores; poids du sédiment humide avec et sans eau des pores,

▼M4

— récipients expérimentaux (matériau et dimension),

— méthode de chargement du sédiment: concentrations expérimentales appliquées, nombre d'expériences identiques et utilisation d'un solvant, le cas échéant,

— phase de stabilisation du système sédiment dopé-eau: durée et conditions,

— conditions d'incubation: température, cycle et intensité de lumière, aération (fréquence et intensité),

— informations détaillées sur la nourriture: type, préparation, quantité et régime d'administration.

Résultats:

— concentrations d'essai nominales, concentrations d'essai mesurées et résultats de toutes les analyses conduites pour déterminer la concentration de la substance d'essai dans le récipient expérimental,

— qualité de l'eau dans les récipients expérimentaux: pH, température, oxygène dissous, dureté et teneur en ammoniac,

— remplacement de l'eau d'essai évaporée, le cas échéant,

— nombre de moucherons mâles et femelles émergés par récipient et par jour,

— nombre de larves non émergées sous la forme de moucherons par récipient,

— poids sec individuel moyen des larves par récipient, et par stade larvaire, s'il y a lieu,

— pourcentage d'émergence par expérience identique et concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucherons mâles et femelles),

— vitesse de développement moyenne des moucherons totalement émergés par expérience identique et concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucherons mâles et femelles),

— estimation des effets toxiques observés, par exemple CE_x (et intervalles de confiance associés), CSEO et/ou CMEO, et méthodes statistiques employées pour les déterminer,

— analyse des résultats, y compris les répercussions sur les résultats d'un écart éventuel à la présente méthode d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R. *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

▼M4

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J., and Kirby R.S. (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations, n° 23.

(13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

(14) Méthode d'essai C.8 de la présente annexe, Toxicité pour les vers de terre.

(15) Suedel B.C. and J.H. Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

(16) Naylor C. and C. Rodrigues (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(17) Dunnett C.W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.

(18) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482-491.

(19) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(20) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

(21) Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577-585.

(22) Christensen E.R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

(23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485-1494.

(24) Slob W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

Appendice 1

DÉFINITIONS

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente méthode d'essai:

Le **sédiment reconstitué**, ou artificiel ou synthétique, désigne le mélange de matériaux utilisés pour reproduire au mieux les composants physiques d'un sédiment naturel.

L'**eau sus-jacente** est l'eau surmontant le sédiment dans le récipient expérimental.

L'**eau interstitielle**, ou l'eau des pores, se réfère à l'eau qui occupe les vides laissés entre le sédiment et les particules de sol.

Le **sédiment dopé** est un sédiment auquel on a ajouté la substance d'essai.

Une **substance d'essai** est toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼M4

Appendice 2

Recommandations pour la culture de *Chironomus riparius*

1. Les larves de *Chironomus* peuvent être élevées dans des cristallisoirs ou de grands récipients. Du sable quartzique fin est déposé en couche mince (environ 5 à 10 mm d'épaisseur) sur le fond du récipient. Le Kieselguhr (par exemple l'art. 8117 de Merck) convient aussi comme substrat (une couche encore plus mince de quelques millimètres à peine suffit). Une eau de qualité appropriée, profonde de plusieurs centimètres, vient ensuite recouvrir le substrat. En cas d'évaporation, le niveau d'eau doit toujours être ramené à sa hauteur initiale, afin de prévenir toute dessiccation. L'eau peut être remplacée, si nécessaire. Une légère aération est fournie. Les récipients d'élevage des larves doivent être placés dans des cages appropriées, afin d'empêcher la fuite des adultes émergeant. La cage sera suffisamment grande pour permettre aux adultes émergés d'essaimer, sans quoi la copulation risque de ne pas avoir lieu (dimensions minimales: 30 × 30 × 30 cm).

2. Les cages doivent être gardées à température ambiante, ou à 20 ± 2 °C si elles sont installées dans une chambre à ambiance constante, avec une photopériode de 16 heures de lumière (intensité: environ 1 000 lux) et 8 heures d'obscurité. Une humidité relative de l'air inférieure à 60 % serait susceptible d'empêcher la reproduction.

Eau de dilution

3. Toute eau naturelle ou reconstituée appropriée peut être utilisée. L'eau d'un puits, de l'eau du robinet déchlorée et un milieu artificiel (Elendt «M4» ou «M7», voir ci-après) sont souvent utilisés. L'eau doit être aérée avant emploi. Si nécessaire, on peut renouveler l'eau de culture en versant ou en siphonnant soigneusement l'eau usée des récipients expérimentaux, sans détruire les tubes des larves.

Alimentation des larves

4. Les larves de *Chironomus* reçoivent des paillettes pour poissons (Tetra-Min®, TetraPhyll® ou une autre marque déposée équivalente), à raison d'environ 250 mg par récipient et par jour. Cette nourriture peut être administrée sous la forme d'une poudre moulue à sec ou d'une suspension dans l'eau: 1,0 g de paillettes ajoutées à 20 ml d'eau de dilution et agitées de façon à obtenir un mélange homogène. Cette préparation peut être administrée à raison d'environ 5 ml par récipient et par jour (agiter avant emploi). Les larves plus âgées peuvent en recevoir plus.

5. La nourriture est ajustée en fonction de la qualité de l'eau. Si le milieu de culture devient trouble, il convient de réduire la ration. Les quantités de nourriture données sont soigneusement notées. Un manque de nourriture fera émigrer les larves vers la colonne d'eau, tandis qu'un excès de nourriture intensifiera l'activité microbienne et abaissera la concentration d'oxygène. Ces deux conditions sont susceptibles de ralentir la croissance des organismes.

6. Certaines cellules d'algues vertes (*Scenedesmus subspicatus, Chlorella vulgaris*) peuvent aussi être ajoutées lors de la préparation de nouveaux récipients de culture.

Alimentation des adultes émergents

7. Certains expérimentateurs ont suggéré de nourrir les adultes émergés au moyen d'un tampon d'ouate imbibé d'une solution de sucrose saturée.

▼M4

Émergence

8. À 20 ± 2 °C, les adultes commencent à émerger des récipients d'élevage des larves après environ 13 à 15 jours. Il est facile de distinguer les mâles d'après leurs antennes plumeuses.

Amas d'œufs

9. Dès que des adultes sont présents dans la cage d'élevage, il faut vérifier trois fois par semaine, dans tous les récipients d'élevage de larves, si des amas d'œufs gélatineux n'ont pas été déposés. Le cas échéant, les amas d'œufs doivent être soigneusement enlevés et transférés dans un petit récipient contenant un échantillon de l'eau d'élevage. Les amas d'œufs servent à préparer un nouveau récipient de culture (2 à 4 amas d'œufs par récipient, par exemple) ou à pratiquer des essais de toxicité.

10. Les larves au premier stade devraient éclore après 2-3 jours.

Préparation de nouveaux récipients de culture

11. Une fois que les cultures ont été lancées, il devrait être possible de préparer un nouveau récipient de culture de larves, une fois par semaine ou moins souvent, suivant les besoins de l'essai, et de retirer les récipients plus anciens après que les moucherons adultes ont émergé. Ce système permet d'obtenir régulièrement un contingent d'adultes, avec une organisation minimale.

Préparation des solutions d'essai «M4» et «M7»

12. Elendt (1990) a décrit le milieu «M4». Le milieu «M7» est préparé comme le milieu «M4», sauf pour les substances reprises au tableau 1, dont les concentrations sont quatre fois plus faibles dans le milieu «M7» que dans le milieu «M4». Une publication sur le milieu «M7» est en préparation (Elendt, communication personnelle). La solution d'essai ne doit pas être préparée selon les instructions d'Elendt et Bias (1990), car les concentrations de $NaSiO_3 5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 et K_2HPO_4 indiquées pour la préparation des solutions mères ne conviennent pas.

Préparation du milieu «M7»

13. Chaque solution mère (I) est préparée séparément et une solution mère combinée (II) est préparée à partir de ces solutions mères (I) (voir tableau 1). Cinquante millilitres de la solution mère combinée (II) additionnés de la quantité de chaque solution mère de macronutriments indiquée au tableau 2 sont amenés à 1 litre avec de l'eau désionisée pour préparer le milieu «M7». On prépare une solution mère de vitamines en ajoutant trois vitamines à de l'eau désionisée, comme indiqué au tableau 3 et on verse 0,1 ml de la solution mère combinée de vitamines au milieu «M7» final, peu avant l'emploi (la solution mère de vitamines est stockée congelée par petites aliquotes). Le milieu est aéré et stabilisé.

BIBLIOGRAPHIE:

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

▼**M4**

Tableau 1

Solutions mères d'éléments en traces pour les milieux M4 et M7

Solutions mères (I)	Quantité (mg) pour former une solution d'1 litre avec de l'eau désionisée	Pour préparer la solution mère combinée (II): mélanger les quantités suivantes (ml) de solutions mères (I) et compléter à 1 litre avec de l'eau désionisée		Concentrations finales dans les solutions expérimentales (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Ces substances sont dosées différemment en M4 et M7, comme indiqué plus haut.
(2) Ces solutions sont préparées séparément, puis mélangées et autoclavées immédiatement après.

Tableau 2

Solutions mères de macronutriments pour les milieux M4 et M7

	Quantité (mg) pour former une solution d'1 litre avec de l'eau désionisée	Quantités de solutions mères de macronutriments ajoutées pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions expérimentales M4 et M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tableau 3

Solution mère de vitamines pour les milieux M4 et M7. Les trois solutions de vitamines seront mélangées de façon à ne former qu'une solution mère de vitamines

	Quantité pour former une solution d'un litre avec de l'eau désionisée (mg)	Quantité de solution mère de vitamines ajoutée pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions d'essai M4 et M7 (mg/l)
Hydrochlorure de thiamine	750	0,1	0,075
Cyanocobalamine (B12)	10	0,1	0,0010
Biotine	7,5	0,1	0,00075

BIBLIOGRAPHIE:

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Appendice 3

PRÉPARATION DU SÉDIMENT RECONSTITUÉ

Composition du sédiment

Le sédiment sera reconstitué comme suit:

Ingrédient	Caractéristiques	% du sédiment poids sec
Tourbe	Tourbe de sphaigne, pH aussi proche que possible de 5,5-6,0, pas de résidus de plantes visibles, finement broyée, particules (≤ 1 mm) et séchée à l'air	4 - 5
Sable quartzique	Dimension des particules: > 50 % des particules doivent mesurer entre 50 et 200 μm	75 - 76
Argile kaolinique	Taux de kaolinite ≥ 30 %	20
Carbone organique	Ajusté par l'addition de tourbe et de sable	2 (± 0,5)
Carbonate de calcium	$CaCO_3$, pulvérisé, chimiquement pur	0,05 - 0,1
Eau	Conductivité ≤ 10 μS/cm	30 - 50

Préparation

La tourbe est séchée à l'air et broyée en poudre fine. Une suspension de la quantité requise de poudre de tourbe dans de l'eau désionisée est préparée à l'aide d'un homogénéisateur à haute performance. Le pH de cette suspension est ajusté à 5,5 ± 0,5 avec du $CaCO_3$. La suspension est conditionnée durant au moins deux jours en l'agitant doucement à 20 ± 2 °C, afin de stabiliser le pH et d'établir une flore microbienne stable. Le pH est vérifié à nouveau; il devrait atteindre 6,0 ± 0,5. Ensuite la suspension de tourbe est mélangée avec les autres ingrédients (sable et argile kaolinique) et de l'eau désionisée pour former un sédiment homogène avec une teneur en eau de 30 à 50 % du poids sec du sédiment. Le pH du mélange final est encore mesuré et ajusté à 6,5-7,5 avec du $CaCO_3$, si nécessaire. On prélève des échantillons de sédiment afin de déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique. Ensuite, avant d'utiliser le sédiment reconstitué dans l'essai de toxicité sur les chironomes, il est recommandé de le conditionner durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui seront appliquées durant l'essai subséquent.

Stockage

Les ingrédients secs destinés à la préparation du sédiment artificiel peuvent être entreposés dans un endroit sec et frais, à température ambiante. Le sédiment reconstitué (humide) ne doit pas être stocké avant son utilisation dans l'essai. Il doit être utilisé immédiatement après la période de conditionnement de sept jours qui achève sa préparation.

BIBLIOGRAPHIE:

Chapitre C.8 de la présente annexe: Toxicité pour les vers de terre.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial MEDIA. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼**M4**

Appendice 4

Caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable

Substance	Concentrations
Matières particulaires	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Dureté en $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Totalité des pesticides organophosphorés	< 50 ng/l
Totalité des pesticides organochlorés et des biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

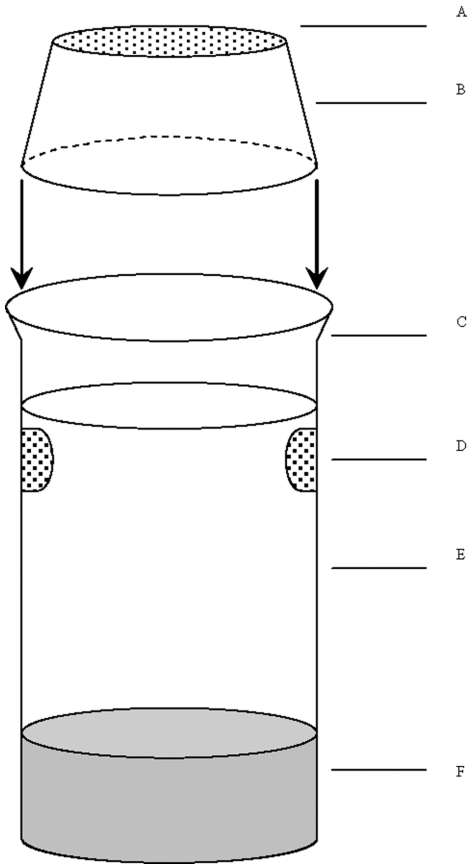
(*) S'il risque d'y avoir une interaction entre les ions qui provoquent la dureté de l'eau et la substance d'essai, il convient d'utiliser une eau moins dure (auquel cas, le milieu Elendt M4 ne pourra pas être utilisé).

▼**M4**

Appendice 5

Conseils pour suivre l'émergence des larves de chironomes

Les béchers expérimentaux sont coiffés par des pièges à émergence, du 20e jour jusqu'à la fin de l'essai. Le schéma ci-dessous illustre un exemple de piège:



A: toile de nylon.

B: coupelles en plastique renversées.

C: bécher expérimental sans bec.

D: ouvertures recouvertes de toile par où s'effectuent les échanges.

E: eau.

F: sédiment.

▼M4

C.28. ESSAI DE TOXICITÉ SUR LES CHIRONOMES DANS UN SYSTÈME EAU CHARGÉE-SÉDIMENT

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 219 de l'OCDE (2004) pour les essais de produits chimiques. Elles est conçue pour évaluer les effets d'une exposition prolongée à des substances chimiques sur des larves de *Chironomus* sp., un diptère vivant dans les sédiments d'eau douce. Elle s'inspire principalement de la ligne directrice du BBA, dans laquelle l'exposition s'effectue à l'aide d'un système expérimental sédiment-eau, composé de sol artificiel et d'une colonne d'eau (1). Elle tient compte également des protocoles d'essais de toxicité sur *Chironomus riparius* et *Chironomus tentans*, mis au point en Europe et en Amérique du Nord (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) et soumis à des essais circulaires (1) (6) (9). D'autres espèces de chironomes bien documentées peuvent aussi être employées, par exemple *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).

2. Le scénario d'exposition appliqué dans la présente méthode d'essai consiste à introduire la substance d'essai dans l'eau. La sélection du scénario d'exposition dépend de la finalité de l'essai. Le scénario d'exposition qui consiste à doper la colonne d'eau, vise à simuler des pertes par dispersion lors de l'épandage de pesticides et couvre le pic de concentrations initial dans l'eau interstitielle. Il s'applique également à d'autres types d'exposition (notamment des fuites de produits chimiques), à l'exclusion des processus d'accumulation d'une durée supérieure à celle de l'essai.

3. En général, les substances à tester sur des organismes vivant dans les sédiments subsistent longtemps dans ce compartiment. Ces organismes peuvent être exposés par diverses voies. L'importance relative de chaque voie d'exposition et le temps pris par chacune d'entre elles pour contribuer à l'effet toxique global dépendent des propriétés physico-chimiques de chaque substance chimique. Dans le cas des substances fortement adsorbantes (par exemple avec un log $K_{oe} > 5$) ou des substances liées de façon covalente au sédiment, l'ingestion d'aliments contaminés peut constituer une voie d'exposition non négligeable. Afin de ne pas sous-estimer la toxicité des substances fortement lipophiles, on envisagera d'ajouter de la nourriture au sédiment avant l'application de la substance d'essai. La présente méthode d'essai est axée sur l'exposition à long terme, de façon à couvrir toutes les voies d'exposition potentielles. L'essai dure de 20 à 28 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* et de 28 à 65 jours pour *C. tentans*. Si l'on a besoin de données à court terme pour un motif précis, par exemple pour étudier les effets de substances chimiques instables, des récipients supplémentaires, ajoutés au dispositif expérimental, peuvent être retirés après 10 jours d'essai.

4. Les effets mesurés sont le nombre total d'adultes émergés et temps écoulé jusqu'à l'émergence. Si l'on a besoin de données à court terme, il est recommandé de ne mesurer la survie et la croissance des larves qu'après 10 jours, en ajoutant le nombre nécessaire de récipients supplémentaires.

5. L'utilisation d'un sédiment reconstitué est recommandée en raison de ses avantages par rapport aux sédiments naturels:

— la variabilité expérimentale est réduite parce que le sédiment reconstitué forme une «matrice normalisée» reproductible; en outre, il n'est plus nécessaire de trouver des sources de sédiments non contaminés et non pollués,

— les essais peuvent être effectués à n'importe quel moment de l'année, la variabilité saisonnière n'intervenant plus et il n'est pas nécessaire de traiter préalablement le sédiment afin d'éliminer la faune indigène; l'utilisation de sédiments reconstitués diminue aussi le coût associé à la collecte sur le terrain d'une quantité suffisante de sédiments pour les essais systématiques,

▼M4

— les sédiments reconstitués permettent de comparer la toxicité des substances et de les classer en conséquence; les essais pratiqués sur des sédiments naturels et artificiels ont fourni des données de toxicité comparables pour plusieurs substances chimiques (2).

6. L'appendice 1 contient les définitions applicables à la présente méthode d'essai.

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. Des chironomes au premier stade larvaire sont exposés à une gamme de concentrations de la substance d'essai dans un système sédiment-eau. L'essai débute par l'introduction de larves au premier stade dans les béchers expérimentaux contenant le système sédiment-eau et l'ajout de la substance d'essai à l'eau. L'émergence des chironomes et leur vitesse de développement sont mesurées à la fin de l'essai. La survie des larves et leur poids peuvent aussi être mesurés après 10 jours si nécessaire (en ajoutant le nombre d'expériences identiques requis). Ces données sont analysées, soit à l'aide d'un modèle de régression pour estimer la concentration qui entraînerait une réduction de x % de l'émergence ou de la survie des larves ou de leur croissance (par exemple CE_{15}, CE_{50}, etc.), soit par la vérification d'une hypothèse statistique afin de déterminer une CSEO/CMEO. Cette dernière requiert une comparaison entre les valeurs efficaces et les valeurs des témoins à l'aide de tests statistiques.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

8. Il faudrait connaître l'hydrosolubilité de la substance d'essai, sa pression de vapeur, son coefficient de partage mesuré ou calculé dans le sédiment et sa stabilité dans l'eau et le sédiment. Il convient de disposer d'une méthode d'analyse fiable pour quantifier la substance d'essai dans l'eau sus-jacente, l'eau interstitielle et le sédiment, et pour laquelle la précision et le seuil de détection sont connus. Il est également utile de connaître la formule structurale et la pureté de la substance d'essai ainsi que son devenir chimique (par exemple dissipation, dégradation abiotique et biotique, etc.). Des indications complémentaires pour tester les substances se prêtant difficilement à l'essai en raison de leurs propriétés physico-chimiques sont fournies à la référence (12).

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

9. Des substances de référence pourront être testées régulièrement pour démontrer la fiabilité du protocole et des conditions de l'essai. Voici quelques exemples de toxiques de référence ayant fait leurs preuves dans des essais circulaires et des études de validation: lindane, trifluraline, pentachlorophénol, chlorure de cadmium et chlorure de potassium (1) (2) (5) (6) (13).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

10. Pour que l'essai soit valide, les conditions suivantes doivent être remplies:

— l'émergence chez les témoins doit atteindre au moins 70 % à la fin de l'essai (1) (6),

— s'agissant de *C. riparius* et *C. yoshimatsui*, l'émergence au stade adulte dans les récipients témoins doit avoir lieu entre 12 et 23 jours après leur introduction dans les récipients expérimentaux; *C. tentans* nécessite une période de 20 à 65 jours,

— à la fin de l'essai, le pH et la concentration d'oxygène dissous seront mesurés dans chaque récipient. La concentration d'oxygène devrait atteindre au moins 60 % de la valeur de saturation en air (VSA) à la température appliquée et le pH de l'eau sus-jacente devrait être compris entre 6 et 9 dans tous les récipients expérimentaux,

▼M4

— la température de l'eau ne devrait pas varier de plus de ± 1,0 °C et pourrait être contrôlée grâce à une chambre isotherme, auquel cas la température de la chambre devra être confirmée à intervalles appropriés.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Récipients expérimentaux

11. L'essai se déroule dans des béchers en verre de 600 ml, mesurant 8 cm de diamètre. D'autres récipients peuvent être utilisés à condition qu'ils permettent de garantir une profondeur adéquate d'eau et de sédiment. Le sédiment doit offrir une superficie de 2 à 3 cm^2 par larve. Le quotient de la profondeur de la couche de sédiment par la profondeur de la couche d'eau sus-jacente doit être égal à 1/4. Les récipients et les autres appareils qui entreront en contact avec le système d'essai doivent être composés uniquement de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte (par exemple du Téflon).

Sélection des espèces

12. *Chironomus riparius* est l'espèce qui convient le mieux. *Chironomus tentans* peut aussi être utilisé, mais il est plus difficile à manipuler et nécessite une période d'essai plus longue. *Chironomus yoshimatsui* convient également. La méthode de culture de *Chironomus riparius* est détaillée à l'appendice 2. D'autres documents décrivent les conditions de culture des autres espèces: *Chironomus tentans* (4) et *Chironomus yoshimatsui* (11). L'identification des espèces est à confirmer avant l'essai, mais n'est pas requise avant chaque essai si les organismes proviennent d'un élevage interne.

Sédiment

13. Il est préférable d'employer un sédiment reconstitué (également dénommé sédiment artificiel ou synthétique). Néanmoins, si l'on opte pour un sédiment naturel, il faudrait le caractériser, au moins quant au pH et à la teneur en carbone organique (la détermination d'autres paramètres, tels que le rapport C/N et la granulométrie est aussi recommandée), et s'assurer qu'il n'est pas contaminé et n'abrite pas d'autres organismes qui pourraient entrer en compétition avec les chironomes ou les consommer. Avant d'utiliser un sédiment naturel dans un essai de toxicité sur les chironomes, il est également recommandé de le maintenir durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui seront appliquées durant l'essai (conditionnement). Le sédiment reconstitué décrit ci-dessous, basé sur le sol artificiel utilisé dans la méthode d'essai C.8 est recommandé (14) (1) (15) (16):

a) 4-5 % (poids sec) de tourbe, avec un pH aussi proche que possible de 5,5 à 6,0; il est important d'utiliser une tourbe sous forme de poudre, finement broyée (dimension des particules ≤ 1 mm) et séchée uniquement à l'air;

b) 20 % (poids sec) d'argile kaolinique (teneur en kaolinite de préférence supérieure à 30 %);

c) 75-76 % (poids sec) de sable quartzique (composé en majorité de sable fin, plus de 50 % des particules mesurant entre 50 et 200 μm);

d) ajouter de l'eau désionisée jusqu'à ce que la teneur en humidité du mélange final atteigne 30 à 50 %;

e) ajouter du carbonate de calcium de qualité chimiquement pure ($CaCO_3$) pour ajuster le pH du mélange final de sédiments à 7,0 ± 0,5;

f) il convient d'obtenir 2 % (± 0,5 %) de carbone organique dans le mélange final en y ajoutant les quantités appropriées de tourbe et de sable, comme indiqué en a) et en c).

▼M4

14. Les sources de tourbe, d'argile kaolinique et de sable doivent être connues. On vérifiera que les composants du sédiment ne sont pas contaminés par des substances chimiques (par exemple des métaux lourds, des composés organochlorés, organophosphorés, etc.). Un exemple de préparation de sédiment reconstitué est décrit à l'appendice 3. Les composants peuvent aussi être mélangés à l'état sec, à condition de démontrer qu'après l'ajout de l'eau sus-jacente, les composants du sédiment ne se séparent pas (flottement de particules de tourbe, par exemple) et que la tourbe ou le sédiment sont suffisamment conditionnés.

Eau

15. Toute eau conforme aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable selon les critères spécifiés aux appendices 2 et 4 convient à l'essai. Toute eau appropriée, naturelle (eau superficielle ou souterraine), reconstituée (voir appendice 2) ou eau du robinet déchlorée, est acceptable comme eau pour l'élevage et les essais si les chironomes y survivent sur toute la durée de l'élevage et de l'essai sans manifester de signes de stress. Au début de l'essai, le pH de l'eau d'essai se situera entre 6 et 9 et sa dureté totale ne dépassera pas 400 mg/l en $CaCO_3$. Néanmoins, si l'on suspecte une interaction entre les ions qui provoquent la dureté et la substance d'essai, il faudra utiliser une eau moins dure (et ne pas employer le milieu Elendt M4 dans ce cas). Le même type d'eau doit être utilisé tout au long de l'étude. Les caractéristiques de la qualité de l'eau énumérées à l'appendice 4 sont à mesurer au moins deux fois par an ou chaque fois que ses caractéristiques sont susceptibles d'avoir été significativement modifiées.

Solutions mères – eau chargée

16. Les concentrations expérimentales sont calculées en fonction des concentrations dans la colonne d'eau recouvrant le sédiment. Les solutions d'essai sont généralement préparées aux concentrations choisies par dilution d'une solution mère. Il est préférable de préparer les solutions mères en dissolvant la substance d'essai dans le milieu d'essai. Dans certains cas, il sera nécessaire d'utiliser des solvants ou des dispersants pour obtenir une solution mère à la concentration voulue. Voici quelques exemples de solvants appropriés: acétone, éthanol, méthanol, éthylèneglycol, monoéthyléther, diméthyléther d'éthylèneglycol, diméthylformamide et triéthylèneglycol. Les dispersants qui peuvent être utilisés sont le Cremophor RH40, le Tween 80, la méthylcellulose à 0,01 % et l'HCO-40. La concentration de l'agent solubilisant dans le milieu d'essai final doit être minimale ($\leq$ 0,1 ml/l) et identique dans tous les traitements. L'agent solubilisant, s'il est utilisé, ne doit pas avoir d'effets significatifs sur la survie, ni d'effet nocif visible sur les larves de chironomes, et ce d'après l'observation des organismes du récipient témoin traité uniquement au solvant. Néanmoins, l'utilisation de ces substances est à éviter dans la mesure du possible.

CONCEPTION DE L'ESSAI

17. La conception de l'essai définit le nombre et l'espacement des concentrations expérimentales, le nombre de récipients à chaque concentration et le nombre de larves par récipient. La marche à suivre pour estimer une valeur de CE, la CSEO et effectuer un essai limite est décrite. L'analyse de régression est préférable à une approche par vérification d'hypothèses.

Conduite d'une analyse de régression

18. La concentration efficace (par exemple, CE_{15}, CE_{50}) et la gamme de concentrations dans laquelle l'effet de la substance d'essai est d'intérêt doivent être couvertes par les concentrations incluses dans l'essai. Généralement, l'exactitude, et plus particulièrement la validité, de l'estimation des concentrations efficaces (CE_x) s'accroissent lorsque la concentration efficace se situe dans la

▼M4

gamme des concentrations testées. Il faut éviter d'extrapoler des résultats très en dessous de la concentration efficace la plus faible ou au-dessus de la concentration maximale. Il est utile de conduire un essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur afin de délimiter la gamme des concentrations à appliquer (voir paragraphe 27).

19. S'il faut estimer la CE_x, au moins cinq concentrations et trois répétitions par concentration doivent être testées. En tout état de cause, il est recommandé de tester suffisamment de concentrations pour obtenir une bonne estimation du modèle. Le facteur séparant les concentrations ne doit pas excéder deux (sauf dans les cas où la courbe dose-effet présente une pente faible). Le nombre de répétitions par traitement peut être diminué si le nombre de concentrations expérimentales entraînant différents effets est augmenté. L'augmentation du nombre de répétitions ou la contraction des intervalles entre les concentrations expérimentales tend à réduire les intervalles de confiance pour l'essai. Le nombre de répétitions sera augmenté s'il y a lieu d'estimer le taux de survie et la croissance des larves après dix jours.

Procédure d'estimation d'une CSEO/CMEO

20. S'il faut estimer la CMEO ou la CSEO, il convient de tester cinq concentrations expérimentales et au moins quatre répétitions par concentration, le facteur séparant les concentrations n'excédant pas deux. Le nombre d'expériences identiques doit être tel qu'il fournit une puissance statistique permettant de détecter une différence de 20 % avec le témoin, au seuil de signification statistique de 5 % (p = 0,05). S'agissant de la vitesse de développement, une analyse de la variance (ANOVA) convient généralement, telle que le test de Dunnett ou le test de Williams (17) (18) (19) (20). S'agissant du taux d'émergence, le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction selon Bonferroni) ou le test de Mantel-Haenszel peuvent être utilisés.

Essai limite

21. Si l'essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations n'a engendré aucun effet, un essai limite peut être conduit (une concentration expérimentale et un témoin). L'essai limite vise à montrer que la concentration toxique de la substance d'essai est supérieure à la concentration limite testée. Aucune concentration ne peut être recommandée pour cette méthode d'essai; cela est laissé à l'appréciation des instances réglementaires. Généralement, il est nécessaire de mener au moins six répétitions pour les organismes traités et les témoins. Il y a lieu de démontrer que la puissance statistique est suffisante pour révéler une différence de 20 % avec les témoins, au seuil de signification statistique de 5 % (p = 0,05). En ce qui concerne l'effet sur la vitesse de développement et sur le poids, le test t constitue une méthode statistique appropriée, si les données respectent les conditions exigées par ce test (normalité, variances homogènes). On pourra recourir au test t à variance inégale ou à un test non paramétrique, tel que le test de Wilcoxon-Mann-Whitney si ces conditions ne sont pas remplies. S'agissant du taux d'émergence, le test exact de Fisher est approprié.

MODE OPÉRATOIRE

Conditions d'exposition

Préparation du système eau chargée-sédiment

22. Une quantité appropriée de sédiment reconstitué (voir paragraphes 13-14 et appendice 3) est déposée dans les récipients expérimentaux, de façon à former une couche d'au moins 1,5 cm. La profondeur de l'eau versée sur ce sédiment atteindra 6 cm (voir paragraphe 15). Le ratio entre la profondeur du sédiment et la profondeur de l'eau n'excédera pas 1/4 et la couche de sédiment ne dépassera pas 3 cm. Le système sédiment-eau sera laissé sous aération légère pendant 7 jours avant l'ajout des organismes d'essai (voir paragraphe 14 et appendice 3). Afin d'éviter la séparation des constituants du sédiment et la resuspension des particules fines durant le remplissage de la colonne d'eau, on peut recouvrir le sédiment d'un disque en plastique et retirer le disque juste après le remplissage. D'autres dispositifs conviennent également.

▼M4

23. Les récipients expérimentaux doivent être couverts (par des plaques de verre, par exemple). On prendra soin de remplacer les volumes d'eau évaporée durant l'étude, le cas échéant, et ce avec de l'eau distillée ou désionisée afin d'empêcher l'accumulation de sels.

Introduction des organismes d'essai

24. Quatre à cinq jours avant d'introduire les organismes d'essai dans les récipients, des amas d'œufs sont prélevés dans les cultures et déposés dans de petits flacons contenant du milieu de culture. Un milieu plus ancien issu de la culture mère tout comme un milieu fraîchement préparé peuvent être utilisés. Si ce dernier est utilisé, on ajoutera une petite quantité de nourriture, par exemple des algues vertes et/ou quelques gouttes du filtrat d'une suspension de paillettes pour poissons finement broyées, au milieu de culture (voir appendice 2). Seuls des amas d'œufs fraîchement pondus peuvent être utilisés. Normalement, les larves commencent à éclore quelques jours après la ponte (2 à 3 jours pour *Chironomus riparius* à 20 °C et 1 à 4 jours pour *Chironomus tentans* à 23 °C et *Chironomus yoshimatsui* à 25 °C) et le développement des larves se déroule en quatre stades, dont chacun dure 4 à 8 jours. Cet essai se pratique au premier stade larvaire (2-3 ou 1-4 jours après l'éclosion). Il est possible de vérifier le stade de développement des moucherons d'après la largeur de la capsule céphalique (6).

25. Vingt larves au premier stade, choisies au hasard, sont déposées dans chaque récipient contenant le sédiment chargé et l'eau, à l'aide d'une pipette émoussée. L'aération de l'eau doit être interrompue dès qu'on introduit les larves dans les récipients expérimentaux, et ce durant 24 heures après l'ajout des larves (voir paragraphes 24 et 32). Selon le protocole expérimental suivi (voir paragraphes 19 et 20), le nombre de larves utilisées par concentration s'élève au moins à 60 pour l'estimation d'une valeur de concentration efficace (CE) et à 80 pour la détermination de la CSEO.

26. Vingt-quatre heures après l'introduction des larves dans les récipients expérimentaux, la substance d'essai est ajoutée à la colonne d'eau sus-jacente et une légère aération est à nouveau dispensée. De petits volumes de la solution contenant la substance d'essai sont injectés en dessous de la surface de la colonne d'eau à l'aide d'une pipette. Ensuite, il convient de mélanger l'eau sus-jacente en prenant soin de ne pas remuer le sédiment.

Concentrations d'essai

27. Il peut être utile de conduire un essai de détermination de l'ordre de grandeur pour délimiter la gamme de concentrations à appliquer dans l'essai proprement dit. À cet effet, on utilise une série de concentrations largement espacées de la substance d'essai. Afin de reproduire la même densité de surface par chironome que dans l'essai proprement dit, les chironomes sont exposés à chaque concentration de la substance d'essai durant une période permettant d'estimer les concentrations expérimentales appropriées et aucune expérience identique n'est nécessaire.

28. Les concentrations expérimentales pour l'essai définitif sont choisies en fonction des résultats de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur. Au moins cinq concentrations doivent être appliquées et sélectionnées comme indiqué aux paragraphes 18 à 20.

Témoins

29. L'essai comportera le nombre nécessaire de récipients témoins pourvus du sédiment mais exempts de toute substance d'essai (voir paragraphes 19-20). Si la substance d'essai a été appliquée à l'aide d'un solvant (voir paragraphe 16), il convient d'ajouter un témoin dont le sédiment contient également le solvant.

▼M4

Système expérimental

30. Des systèmes statiques sont utilisés. Des systèmes semi-statiques ou à écoulement continu avec renouvellement intermittent ou continu de l'eau sus-jacente peuvent être utilisés dans des cas exceptionnels, par exemple si les spécifications de la qualité de l'eau deviennent inappropriées pour l'organisme d'expérience ou affectent l'équilibre chimique (si, par exemple, la concentration d'oxygène dissous devient trop basse, la concentration des excréta augmente de façon trop importante ou si des minéraux lessivés à partir du sédiment affectent le pH et/ou la dureté de l'eau). Néanmoins, d'autres méthodes d'amélioration de la qualité de l'eau sus-jacente, telles que l'aération, seront normalement suffisantes et préférables.

Alimentation

31. Les larves ont besoin d'être nourries, de préférence quotidiennement ou au moins trois fois par semaine. Durant les dix premiers jours, chaque jeune larve recevra quotidiennement 0,25 à 0,5 mg (0,35-0,5 mg pour *C. yoshimatsui*) de nourriture pour poissons (suspendue dans l'eau ou finement broyée, par exemple TetraMin ou TetraPhyll; voir les détails à l'appendice 2). Il peut être nécessaire d'augmenter légèrement cette quantité pour les larves plus âgées: 0,5-1 mg par larve et par jour devrait suffire pour le reste de l'essai. On diminuera la ration alimentaire de tous les organismes traités et témoins si des champignons se développent ou si des organismes témoins meurent. Si la croissance fongique s'avère impossible à enrayer, l'essai doit être renouvelé. Si l'essai porte sur des substances fortement adsorbantes (par exemple avec un log K_{oe} > 5) ou des substances liées de façon covalente au sédiment, la quantité de nourriture nécessaire à la survie et à la croissance naturelle des organismes peut être incorporée au sédiment reconstitué avant la période de stabilisation. Dans ce cas, la nourriture pour poissons est remplacée par une ration végétale, par exemple 0,5 % (poids sec) de feuilles finement broyées d'ortie (*Urtica dioica*), de mûrier (*Morus alba*), de trèfle blanc ou rampant (*Trifolium repens*), d'épinard (*Spinacia oleracea*) ou d'un autre matériau végétal (*Cerophyl* ou alpha-cellulose).

Conditions d'incubation

32. L'eau sus-jacente est soumise à une légère aération, mise en œuvre de préférence 24 heures après l'introduction des larves et maintenue jusqu'à la fin de l'essai (il faut veiller à ce que la concentration d'oxygène dissous ne tombe pas en dessous de 60 % de la valeur de saturation en air). L'air est insufflé à travers une pipette Pasteur en verre fixée 2 à 3 cm au-dessus de la couche de sédiment (une ou quelques bulles par seconde). Si la substance d'essai est volatile, il faudra éventuellement supprimer l'aération.

33. L'essai est mené à température constante (20 °C ± 2 °C). Pour *C. tentans* et *C. yoshimatsui*, les températures recommandées s'élèvent respectivement à 23 °C et 25 °C (± 2 °C). La photopériode est de 16 heures et l'éclairement compris entre 500 et 1 000 lux.

Durée de l'exposition

34. L'exposition débute avec l'introduction des larves dans les récipients traités et témoins. La durée maximale d'exposition atteint 28 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* et 65 jours pour *C. tentans*. Si les moucherons émergent plus tôt, l'essai peut s'achever au moins cinq jours après l'émergence du dernier adulte témoin.

OBSERVATIONS

Émergence

35. La durée du développement et le nombre total de moucherons mâles et femelles adultes totalement émergés sont à déterminer. Les mâles sont faciles à identifier grâce à leurs antennes plumeuses.

▼M4

36. Au moins trois fois par semaine, on vérifiera que les organismes des récipients d'essai ne manifestent aucun comportement anormal (sortie du sédiment, nage inhabituelle, par exemple) par rapport aux témoins. Chaque jour, durant la période supposée de l'émergence, il faut compter le nombre de moucherons émergés et consigner le sexe et le nombre de moucherons complètement émergés. Une fois identifiés, les moucherons sont retirés des récipients. Tout amas d'œufs déposé avant la fin de l'essai doit être recensé puis enlevé afin d'empêcher la réintroduction de larves dans le sédiment. Le nombre de pupes visibles n'ayant pas réussi à émerger est aussi enregistré. Des indications sur la façon de mesurer l'émergence sont données à l'appendice 5.

Croissance et survie

37. S'il faut fournir des données sur la survie et la croissance des larves après 10 jours, des récipients expérimentaux supplémentaires seront inclus dès le début de l'essai, pour pouvoir être utilisés ultérieurement. Le sédiment de ces récipients supplémentaires est tamisé à travers des mailles de 250 μm pour retenir les larves. La mort est déterminée par deux critères: l'immobilité et l'absence de réaction à un stimulus mécanique. Les larves non récupérées doivent aussi être comptabilisées parmi les mortes (les larves qui sont mortes au début de l'essai ont pu être dégradées par des microbes). Après avoir déterminé le poids sec (sans cendres) des larves survivantes par récipient expérimental, on calcule le poids sec individuel moyen par récipient. Il est utile d'établir à quel stade se trouvent les larves survivantes, et ce d'après la largeur de la capsule céphalique de chaque individu.

Mesures analytiques

Concentration de la substance d'essai

38. Il est recommandé d'analyser, au minimum, des échantillons de l'eau sus-jacente, de l'eau interstitielle, et du sédiment, au début (de préférence une heure après l'application de la substance d'essai) et à la fin de l'essai, et ce pour la concentration la plus élevée et pour une concentration plus faible. La concentration de la substance d'essai nous renseigne sur le comportement et la répartition de la substance d'essai dans le système eau-sédiment. Le prélèvement d'échantillons de sédiment au début de l'essai risque de perturber le système d'essai (enlèvement de larves, par exemple), il faut donc inclure des récipients expérimentaux supplémentaires pour effectuer des déterminations analytiques au début de l'essai et, s'il y a lieu, au cours de l'essai (voir paragraphe 39). Il n'est pas forcément nécessaire d'analyser le sédiment si la répartition de la substance d'essai entre l'eau et le sédiment a été clairement déterminée par une étude eau/sédiment menée dans des conditions comparables (par exemple, quotient sédiment/eau, type d'application, teneur en carbone organique du sédiment).

39. Lorsqu'on effectue des mesures intermédiaires (par exemple au septième jour) et si l'analyse requiert des échantillons volumineux qui ne peuvent être prélevés des récipients sans influencer le système expérimental, les analyses seront pratiquées sur des échantillons provenant de récipients expérimentaux supplémentaires traités de la même façon (y compris par la présence des organismes d'essai), mais non utilisés pour les observations biologiques.

40. Pour isoler l'eau interstitielle, on recommande de centrifuger des échantillons à 10 000 g et à 4 °C durant 30 minutes. Cependant, s'il est démontré que la substance d'essai ne s'adsorbe pas sur les filtres, la filtration est également acceptable. Avec des échantillons trop petits, il arrive que les concentrations dans l'eau interstitielle soient impossibles à analyser.

▼M4

Paramètres physico-chimiques

41. Le pH, l'oxygène dissous dans l'eau d'essai et la température des récipients expérimentaux doivent être mesurés de façon appropriée (voir paragraphe 10). La dureté de l'eau et la teneur en ammoniac sont mesurées dans les récipients témoins et dans un récipient traité à la concentration la plus élevée, au début et à la fin de l'essai.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

42. Cet essai vise à déterminer l'effet de la substance d'essai sur la vitesse de développement et le nombre total de moucherons mâles et femelles totalement émergés ou, dans le cas de l'essai de 10 jours, les effets sur la survie et le poids des larves. Si rien n'indique que les deux sexes présentent des différences statistiques de sensibilité, les résultats obtenus sur les mâles et les femelles peuvent être regroupés pour l'analyse statistique. Les différences de sensibilité entre les sexes peuvent être appréciées statistiquement par un test (de tableau) a χ^2 - r x 2, par exemple. La survie des larves et le poids sec individuel moyen par récipient doivent être déterminés après dix jours, le cas échéant.

43. Il est préférable de calculer les concentrations efficaces, exprimées en concentrations dans l'eau sus-jacente, en fonction des concentrations mesurées au début de l'essai (voir paragraphe 38).

44. Pour estimer ponctuellement la CE_{50} ou une quelconque CE_x, les statistiques par récipient peuvent être utilisées comme des expériences identiques proprement dites. Lorsqu'on calcule un intervalle de confiance pour une quelconque CE_x, il faut tenir compte de la variabilité entre les récipients ou montrer que celle-ci est négligeable. Si le modèle est ajusté par la méthode des moindres carrés, il convient d'appliquer une transformation des données pour les statistiques par récipient afin d'accroître l'homogénéité de la variance. Toutefois, les valeurs de la CE_x sont à calculer après que les résultats ont été «retransformés» de façon à recouvrer leur valeur originale.

45. Si l'analyse statistique vise à déterminer la CSEO/CMEO par la vérification d'hypothèses, la variabilité entre les récipients doit être prise en compte, par exemple à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA) «emboîtée». Par contre, des tests plus robustes (21) peuvent être utilisés au cas où les hypothèses habituelles de l'analyse de la variance ne se vérifient pas.

Taux d'émergence

46. Le taux d'émergence donne une réponse par tout ou rien et peut être analysé par le test de Cochran-Armitage appliqué de façon régressive si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Dans le cas contraire, un test exact de Fisher ou un test de Mantel-Haenszel avec des valeurs de p corrigées selon Bonferroni-Holm peuvent être employés. S'il s'avère que la variabilité entre expériences identiques à la même concentration est supérieure à ce qu'une distribution binomiale indiquerait (variation souvent qualifiée d'«extra-binomiale»), on appliquera un test plus robuste (Cochran-Armitage ou test exact de Fisher) comme proposé à la référence (21).

47. La somme des moucherons émergés par récipient, n_e, est déterminée et divisée par le nombre de larves introduites, n_a:

$$TE = \frac{n_e}{n_a}$$

▼**M4**

où:

TE = taux d'émergence

n_e = nombre de moucherons émergés par récipient

n_e = nombre de larves introduites par récipient

48. Une variante plus appropriée aux échantillons de grande taille, lorsque la variance est extra-binomiale, consiste à traiter le taux d'émergence comme une réponse continue et à appliquer une méthode telle que le test de Williams, si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les résultats du taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Le test de Dunnett convient dans le cas où la relation ne s'avère pas monotone. Ici, on considère qu'un échantillon est de grande taille lorsque le nombre de moucherons émergés et le nombre de chironomes non émergés dépassent chacun cinq, par récipient d'essai.

49. Pour appliquer l'analyse de la variance (ANOVA), il convient d'appliquer aux valeurs de TE une transformation «arcsinus-racine carrée» ou «Freeman-Tukey» afin d'obtenir une distribution proche de la normale et d'égaliser les variances. Le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction de Bonferroni) ou le test de Mantel-Haenszel peuvent être employés lorsqu'on utilise des fréquences absolues. La transformation arcsinus-racine carrée consiste à calculer l'inverse du sinus ($sinus^{-1}$) de la racine carrée du TE.

50. Pour les taux d'émergence, les valeurs de la CE_x sont calculées par une analyse de régression [ou par probit (22), logit, Weibull, des logiciels commerciaux appropriés, etc.]. Si l'analyse de la régression échoue (par exemple, lorsqu'il y a moins de deux réponses partielles), on fait appel à d'autres méthodes non paramétriques telles que la moyenne mobile ou une simple interpolation.

Vitesse de développement

51. La période moyenne de développement représente le temps moyen écoulé entre l'introduction des larves (jour 0 de l'essai) et l'émergence de la cohorte expérimentale de moucherons (pour calculer la période réelle de développement, il faut tenir compte de l'âge des larves au moment de l'introduction). La vitesse de développement est l'inverse de la période de développement (unité: 1/jour) et représente la partie du développement larvaire qui s'effectue par jour. Pour évaluer la toxicité dans les sédiments, il est préférable de choisir la vitesse de développement car sa variance est plus faible et ses valeurs sont plus homogènes et plus proches d'une distribution normale, en comparaison avec la période de développement. C'est pourquoi les tests paramétriques puissants conviennent mieux à la vitesse de développement qu'à la période de développement. Si la vitesse de développement est traitée comme une réponse continue, les valeurs de la CE_x peuvent être estimées par l'analyse de la régression, par exemple (23), (24).

52. Pour les tests statistiques suivants, le nombre de moucherons observés le jour x sont considérés comme ayant émergé au milieu de l'intervalle de temps compris entre le jour x et le jour x - 1 (1 = longueur de l'intervalle d'observation, habituellement 1 jour). La vitesse de développement moyenne par récipient (x) est calculée comme suit:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

où:

$\overline{x}$: vitesse de développement moyenne par récipient

i: indice de l'intervalle d'observation

m: nombre maximal d'intervalles d'observation

▼M4

f_i: nombre de moucherons émergés durant l'intervalle d'observation i

n_e: nombre total de moucherons émergés à la fin de l'expérience ($=\sum f_i$)

x_i: vitesse de développement des moucherons émergés durant l'intervalle i

$$x_i = 1/\left(jour_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

où:

$jour_i$: jour d'observation (compté à partir de l'application)

l_i: durée de l'intervalle d'observation i (exprimée en jours, habituellement 1 jour)

Rapport d'essai

53. Le rapport d'essai doit fournir au moins les informations suivantes:

Substance d'essai:

— état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (hydrosolubilité, pression de vapeur, coefficient de partage dans le sol (ou dans le sédiment s'il est connu), stabilité dans l'eau, etc.),

— identification chimique (nom courant, nom chimique, formule structurale, numéro CAS, etc.), pureté et méthode d'analyse pour la quantification de la substance d'essai.

Espèce d'essai:

— animal d'essai utilisé: espèce, nom scientifique, source et conditions d'élevage,

— informations sur la manipulation des amas d'œufs et des larves,

— âge des animaux d'expérience au moment où ils ont été déposés dans les récipients d'essai.

Conditions expérimentales:

— sédiment utilisé, c'est-à-dire naturel ou reconstitué,

— pour les sédiments naturels: localisation et description du site de prélèvement et notamment, si possible, son histoire en matière de contamination; caractéristiques: pH, teneur en carbone organique, quotient C/N et granulométrie, le cas échéant,

— préparation du sédiment reconstitué: ingrédients et caractéristiques (teneur en carbone organique, pH, humidité, etc. au début de l'essai),

— préparation de l'eau d'essai (si l'eau est reconstituée) et caractéristiques (concentration d'oxygène, pH, conductivité, dureté, etc. au début de l'essai),

— profondeur du sédiment et de l'eau sus-jacente,

— volume de l'eau sus-jacente et de l'eau interstitielle; poids du sédiment humide avec et sans eau interstitielle,

— récipients expérimentaux (matériau et dimension),

— méthode de préparation des solutions mères et des concentrations expérimentales,

▼M4

— application de la substance d'essai: concentrations expérimentales utilisées, nombre d'expériences identiques et utilisation d'un solvant, le cas échéant,

— conditions d'incubation: température, cycle et intensité de lumière, aération (fréquence et intensité),

— informations détaillées sur la nourriture: type de nourriture, préparation, quantité et régime d'administration.

Résultats:

— concentrations d'essai nominales, concentrations d'essai mesurées et résultats de toutes les analyses conduites pour déterminer la concentration de la substance d'essai dans le récipient expérimental,

— qualité de l'eau dans les récipients expérimentaux: pH, température, oxygène dissous, dureté et teneur en ammoniac,

— remplacement de l'eau d'essai évaporée, le cas échéant,

— nombre de moucherons mâles et femelles émergés par récipient et par jour,

— nombre de larves non émergées sous la forme de moucherons par récipient,

— poids sec individuel moyen des larves par récipient, et par stade larvaire, s'il y a lieu,

— pourcentage d'émergence par expérience identique et par concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucherons mâles et femelles),

— vitesse de développement moyenne des moucherons totalement émergés par expérience identique et par concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucherons mâles et femelles),

— estimation des effets toxiques observés, par exemple CE_x (et intervalles de confiance associés), CSEO et/ou CMEO, et méthodes statistiques employées pour les déterminer,

— analyse des résultats, y compris les répercussions sur les résultats d'un écart éventuel à la présente méthode d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R. *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Environnement Canada (1997). Essai de croissance et de survie de larves de moucherons d'eau douce (*Chironomus tentans* ou *Chironomus riparius*). Méthode d'essai biologique. Rapport SPE 1/RM/32. Décembre 1997.

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

▼M4

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J., Kirby R.S. (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OCDE Publications Hygiène et sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations, n° 23.

(13) Environnement Canada (1995). Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité au moyen de sédiments de contrôle dopés avec un produit toxique de référence. Rapport SPE 1/RM/30. Septembre 1995.

(14) Chapitre C.8 de la présente annexe, Toxicité pour les vers de terre.

(15) Suedel B.C. and Rodgers J.H. (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

(16) Naylor C. and Rodrigues C. (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(17) Dunnett C.W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096-1121.

(18) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

(19) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(20) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531.

(21) Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577-585.

(22) Christensen E.R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

(23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485-1494.

(24) Slob W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

Appendice 1

DÉFINITIONS

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente méthode d'essai:

Le **sédiment reconstitué**, ou artificiel ou synthétique, désigne le mélange de matériaux utilisés pour reproduire au mieux les composants physiques d'un sédiment naturel.

L'**eau sus-jacente** est l'eau recouvrant le sédiment dans le récipient d'essai.

L'**eau interstitielle**, ou l'eau des pores, se réfère à l'eau qui occupe les vides laissés entre le sédiment et les particules de sol.

L'**eau chargée** est l'eau d'essai à laquelle on a ajouté la substance d'essai.

Une **substance d'essai** est toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼M4

Appendice 2

Recommandations pour la culture de *Chironomus riparius*

1. Les larves de *Chironomus* peuvent être élevées dans des cristallisoirs ou de grands récipients. Du sable quartzique fin est déposé en couche mince (environ 5 à 10 mm d'épaisseur) sur le fond du récipient. Le Kieselguhr (par exemple l'art. 8117 de Merck) convient aussi comme substrat (une couche encore plus mince de quelques millimètres à peine suffit). Une eau de qualité appropriée, profonde de plusieurs centimètres, vient ensuite recouvrir le substrat. En cas d'évaporation, le niveau d'eau doit toujours être ramené à sa hauteur initiale, afin de prévenir toute dessiccation. L'eau peut être remplacée, si nécessaire. Une légère aération est fournie. Les récipients d'élevage des larves doivent être placés dans des cages appropriées, afin d'empêcher la fuite des adultes émergeant. La cage sera suffisamment grande pour permettre aux adultes émergés d'essaimer, sans quoi la copulation risque de ne pas avoir lieu (dimensions minimales: 30 × 30 × 30 cm).

2. Les cages doivent être gardées à température ambiante, ou à 20 ± 2 °C si elles sont placées dans une chambre à ambiance constante, avec une photopériode de 16 heures de lumière (intensité: environ 1 000 lux) et 8 heures d'obscurité. Une humidité relative de l'air inférieure à 60 % pourrait empêcher la reproduction.

Eau de dilution

3. Toute eau naturelle ou reconstituée appropriée peut être utilisée. L'eau d'un puits, de l'eau du robinet déchlorée et un milieu artificiel (Elendt «M4» ou «M7», voir ci-après) sont souvent utilisés. L'eau doit être aérée avant l'emploi. Si nécessaire, on peut renouveler l'eau de culture en versant ou en siphonnant soigneusement l'eau usée des récipients expérimentaux, sans détruire les tubes des larves.

Alimentation des larves

4. Les larves de *Chironomus* reçoivent des paillettes pour poissons (Tetra Min®, Tetra Phyll® ou une autre marque déposée équivalente), à raison d'environ 250 mg par récipient et par jour. Cette nourriture peut être administrée sous la forme d'une poudre moulue à sec ou d'une suspension dans l'eau: 1,0 g de paillettes ajoutées à 20 ml d'eau de dilution et agitées de façon à obtenir un mélange homogène. Cette préparation peut être administrée à raison d'environ 5 ml par récipient et par jour (agiter avant emploi). Les larves plus âgées peuvent en recevoir plus.

5. La nourriture est ajustée en fonction de la qualité de l'eau. Si le milieu de culture devient trouble, il convient de réduire la ration. Les quantités de nourriture données sont soigneusement notées. Un manque de nourriture fera émigrer les larves vers la colonne d'eau, tandis qu'un excès de nourriture intensifiera l'activité microbienne et abaissera la concentration d'oxygène. Ces deux conditions sont susceptibles de ralentir la croissance des organismes.

6. Certaines cellules d'algues vertes (*Scenedesmus subspicatus, Chlorella vulgaris*) peuvent aussi être ajoutées lors de la préparation de nouveaux récipients de culture.

Alimentation des adultes émergeant

7. Certains expérimentateurs ont suggéré de nourrir les adultes émergés au moyen d'un tampon d'ouate imbibé d'une solution de sucrose saturée.

▼M4

Émergence

8. À 20 ± 2 °C, les adultes commencent à émerger des récipients d'élevage des larves après environ 13 à 15 jours. Il est facile de distinguer les mâles d'après leurs antennes plumeuses.

Amas d'œufs

9. Dès que des adultes sont présents dans la cage d'élevage, il faut vérifier trois fois par semaine, dans tous les récipients d'élevage de larves, si des amas d'œufs gélatineux n'ont pas été déposés. Le cas échéant, les amas d'œufs doivent être soigneusement enlevés et transférés dans un petit récipient contenant un échantillon de l'eau d'élevage. Les amas d'œufs sont utilisés pour préparer un nouveau récipient de culture (2 à 4 amas d'œufs par récipient, par exemple) ou pratiquer des essais de toxicité.

10. Les larves au premier stade devraient éclore après 2-3 jours.

Préparation de nouveaux récipients de culture

11. Une fois que les cultures ont été lancées, il devrait être possible de préparer un nouveau récipient de culture de larves, une fois par semaine ou moins souvent, suivant les besoins de l'essai, et de retirer les récipients plus anciens après que les moucherons adultes ont émergé. Ce système permet d'obtenir régulièrement un contingent d'adultes, avec une organisation minimale.

Préparation des solutions d'essai «M4» et «M7»

12. Elendt (1990) a décrit le milieu «M4». Le milieu «M7» est préparé comme le milieu «M4», sauf pour les substances reprises au tableau 1, dont les concentrations sont quatre fois plus faibles dans le milieu «M7» que dans le milieu «M4». Une publication sur le milieu «M7» est en préparation (Elendt, communication personnelle). La solution d'essai ne doit pas être préparée selon les instructions d'Elendt et Bias (1990), car les concentrations de $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 et K_2HPO_4 indiquées pour la préparation des solutions mères ne conviennent pas.

Préparation du milieu «M7»

13. Chaque solution mère (I) est préparée séparément et une solution mère combinée (II) est préparée à partir de ces solutions mères (I) (voir tableau 1). 50 ml de la solution mère combinée (II) additionnés de la quantité de chaque solution mère de macronutriments indiquée au tableau 2 sont amenés à 1 l avec de l'eau désionisée pour composer le milieu «M7». On prépare une solution mère de vitamines en ajoutant trois vitamines à de l'eau désionisée, comme indiqué au tableau 3 et on verse 0,1 ml de la solution mère combinée de vitamines au milieu «M7» final, peu avant l'emploi (la solution mère de vitamines est stockée congelée par petites aliquotes). Le milieu est aéré et stabilisé

Tableau 1

Solutions mères d'éléments en traces pour les milieux M4 et M7

Solutions mères (I)	Quantité (mg) pour former une solution d'un litre avec de l'eau désionisée	Pour préparer la solution mère combinée (II): mélanger les quantités suivantes (ml) de solutions mères (I) et compléter à un litre avec de l'eau désionisée		Concentrations finales dans les solutions expérimentales (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M4**

Solutions mères (I)	Quantité (mg) pour former une solution d'un litre avec de l'eau désionisée	Pour préparer la solution mère combinée (II): mélanger les quantités suivantes (ml) de solutions mères (I) et compléter à un litre avec de l'eau désionisée		Concentrations finales dans les solutions expérimentales (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na2EDTA $\cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO4 $\cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Ces substances sont dosées différemment dans M4 et M7, comme indiqué plus haut.
(2) Ces solutions sont préparées séparément, puis mélangées et autoclavées immédiatement après.

Tableau 2

Solutions mères de macronutriments pour les milieux M4 et M7

	Quantité pour former une solution d'un litre avec de l'eau désionisée (mg)	Quantités de solutions mères de macronutriments ajoutées pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions expérimentales M4 et M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tableau 3

Solution mère de vitamines pour les milieux M4 et M7

Les trois solutions de vitamines sont mélangées de façon à ne former qu'une solution mère de vitamines.

	Quantité pour former une solution d'un litre avec de l'eau désionisée (mg)	Quantités de solutions mères de vitamines ajoutées pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions d'essai M4 et M7 (mg/l)
Hydrochlorure de thiamine	750	0,1	0,075
Cyanocobalamine (B12)	10	0,1	0,0010
Biotine	7,5	0,1	0,00075

BIBLIOGRAPHIE:

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

Elendt B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt B.P. and Bias W.-R. (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Appendice 3

PRÉPARATION DU SÉDIMENT RECONSTITUÉ

Composition du sédiment

Le sédiment sera reconstitué comme suit:

Ingrédient	Caractéristiques	% du sédiment poids sec
Tourbe	Tourbe de sphaigne, pH aussi proche que possible de 5,5-6,0, pas de résidus de plantes visibles, finement broyée, particules (≤ 1 mm) et séchée à l'air	4-5
Sable quartzique	Dimension des particules: > 50 % des particules doivent mesurer entre 50 et 200 μm	75-76
Argile kaolinique	Taux de kaolinite ≥ 30 %	20
Carbone organique	Ajusté par l'addition de tourbe et de sable	2 (± 0,5)
Carbonate de calcium	$CaCO_3$, pulvérisé, chimiquement pur	0,05 - 0,1
Eau	Conductivité ≤ 10 μS/cm	30 - 50

Préparation

La tourbe est séchée à l'air et broyée en poudre fine. Une suspension de la quantité requise de poudre de tourbe dans de l'eau désionisée est préparée à l'aide d'un homogénéisateur à haute performance. Le pH de cette suspension est ajusté à 5,5 ± 0,5 avec du $CaCO_3$. La suspension est conditionnée durant au moins deux jours en l'agitant doucement à 20 ± 2 °C, afin de stabiliser le pH et d'établir une flore microbienne stable. Le pH est vérifié à nouveau; il devrait atteindre 6,0 ± 0,5. Ensuite la suspension de tourbe est mélangée avec les autres ingrédients (sable et argile kaolinique) et de l'eau désionisée pour former un sédiment homogène avec une teneur en eau de 30 à 50 % du poids sec du sédiment. Le pH du mélange final est encore mesuré et ajusté à 6,5-7,5 avec du $CaCO_3$, si nécessaire. On prélève des échantillons de sédiment afin de déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique. Ensuite, avant d'utiliser le sédiment reconstitué dans l'essai de toxicité sur les chironomes, il est recommandé de le conditionner durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui seront appliquées durant l'essai subséquent.

Stockage

Les ingrédients secs destinés à la préparation du sédiment artificiel peuvent être entreposés dans un endroit sec et frais, à température ambiante. Le sédiment reconstitué (humide) ne doit pas être stocké avant son utilisation dans l'essai. Il doit être utilisé immédiatement après la période de conditionnement de sept jours qui achève sa préparation.

BIBLIOGRAPHIE:

Chapitre C.8 de la présente annexe: Toxicité pour les vers de terre.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial MEDIA. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼**M4**

Appendice 4

Caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable

Substance	Concentrations
Matières particulaires	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Dureté en $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Totalité des pesticides organophosphorés	< 50 ng/l
Totalité des pesticides organochlorés et des biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

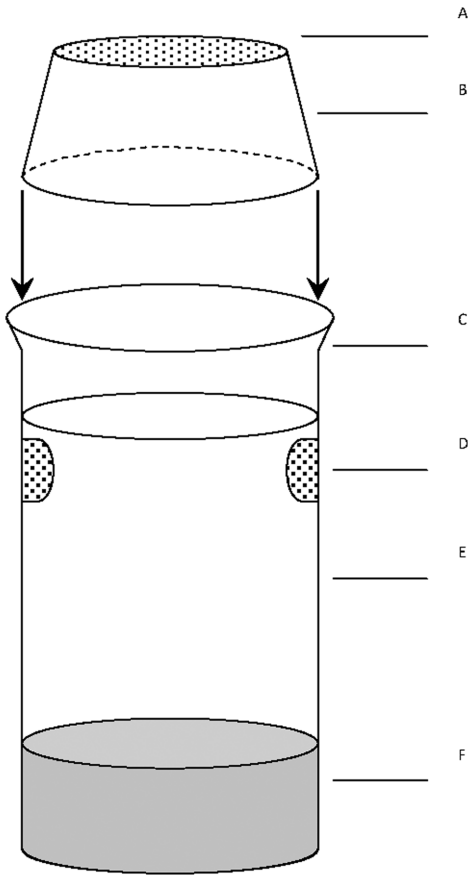
(*) S'il risque d'y avoir une interaction entre les ions qui provoquent la dureté de l'eau et la substance d'essai, il convient d'utiliser une eau moins dure (auquel cas, le milieu Elendt M4 ne pourra pas être utilisé).

▼**M4**

Appendice 5

Conseils pour suivre l'émergence des larves de chironomes

Les béchers expérimentaux sont coiffés par des pièges à émergence, du 20e jour jusqu'à la fin de l'essai. Le schéma ci-dessous illustre un exemple de piège:



A: toile de nylon.

B: coupelles en plastique renversées.

C: bécher expérimental sans bec.

D: ouvertures recouvertes de toile par où s'effectuent les échanges d'eau.

E: eau.

F: sédiment.

▼M4

C.29. BIODÉGRADABILITÉ FACILE – DÉGAGEMENT DE CO_2 DANS DES FLACONS HERMÉTIQUEMENT CLOS (ESSAI DE L'ESPACE DE TÊTE AU-DESSUS DU LIQUIDE)

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 310 (2006) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Cette méthode de criblage permet de classer les substances chimiques en fonction de leur biodégradabilité facile et fournit des informations semblables à celles exposées dans les six méthodes d'essai (A à F) décrites au chapitre C.4 de la présente annexe. Par conséquent, une substance chimique livrant un résultat positif pour cet essai de l'espace de tête peut être considérée comme facilement biodégradable et donc rapidement dégradable dans l'environnement.

2. L'essai, désormais bien mis au point, de dégagement de CO_2 (1), basé sur l'essai original de Sturm (2), qui permet d'évaluer la biodégradabilité des produits chimiques organiques d'après la mesure du dioxyde de carbone produit par l'activité microbiologique, est normalement celui qui se prête le mieux à l'essai des substances chimiques peu solubles et celles fortement adsorbantes. Il est également choisi pour les substances solubles (mais non volatiles) puisque beaucoup considèrent que le dégagement de dioxyde de carbone constitue la seule preuve irréfutable de l'activité microbiologique. La disparition du carbone organique dissous peut faire intervenir des processus physico-chimiques (adsorption, volatilisation, précipitation, hydrolyse) ainsi que l'action microbiologique et de nombreuses réactions non-biologiques consommant de l'oxygène; il est rare que le CO_2 soit produit à partir de produits chimiques organiques par un processus abiotique. Dans les essais original et modifié de Sturm (1) (2), le CO_2 est extrait de la phase liquide et envoyé dans des récipients absorbants par barbotage (passage bulle à bulle d'air traité à travers le milieu liquide pour éliminer le CO_2), alors que dans la version de Larson (3) (4), lors de son transfert du réacteur vers l'absorbeur, le CO_2 traverse un espace de tête contenant de l'air exempt de CO_2, tandis que le réacteur est agité en continu. Le réacteur n'est agité que dans la version de Larson modifiée; l'agitation n'est prescrite que pour les substances insolubles dans la norme ISO 9439 (5) et dans la version originale des États-Unis (6), qui prescrivent toutes deux le barbotage plutôt que le remplacement de l'espace de tête. Dans une autre méthode officielle (7) de l'Agence des États-Unis pour la protection de l'environnement (US EPA), basée sur la méthode de Gledhill (8), le réacteur agité est fermé à l'atmosphère et le CO_2 produit est directement recueilli de la phase gazeuse dans un piège alcalin interne, comme dans les respiromètres classiques de Warburg/Barcroft.

3. Il a toutefois été démontré que le carbone inorganique s'accumule dans le milieu durant l'application de l'essai standard modifié de Sturm à plusieurs substances chimiques (9). La dégradation de l'aniline à 20 mg C/l a produit une concentration assez élevée de carbone inorganique, à savoir 8 mg/l. Autrement dit, la collecte de CO_2 dans les pièges alcalins n'a pas reflété la quantité réelle de CO_2 produite par des processus microbiologiques à des moments intermédiaires au cours de la dégradation. Par conséquent, la prescription selon laquelle une production de CO_2 supérieure à 60 % de la production maximale théorique ($ThCO_2$) doit être atteinte dans un intervalle de 10 jours (les dix jours suivant immédiatement le franchissement du seuil de 10 % de biodégradation) pour une substance d'essai à classer comme facilement biodégradable, ne pourra être respectée pour certaines substances qui rentreraient dans cette classification d'après la disparition du carbone organique dissous.

4. Lorsque le pourcentage de dégradation est inférieur au niveau attendu, il est probable que du carbone inorganique se soit accumulé dans la solution expérimentale. À ce moment-là, la dégradabilité peut être évaluée avec les autres essais de biodégradabilité facile.

▼M4

5. D'autres inconvénients de la méthode de Sturm (laborieuse, longue, davantage sujette à des erreurs expérimentales et non applicable aux substances volatiles) avaient déjà incité les chercheurs à s'orienter vers une technique en flacon hermétiquement clos, autre que celle de Gledhill, plutôt que d'utiliser un écoulement gazeux continu (10) (11). Boatman *et al.* (12) ont réexaminé les méthodes précédentes et adopté un système d'espace de tête fermé dans lequel le CO_2 est libéré dans l'espace de tête à la fin de l'incubation moyennant une acidification du milieu. Le CO_2 était mesuré par chromatographie gazeuse (carbone inorganique) dans des échantillons prélevés automatiquement de l'espace de tête, mais le carbone inorganique dissous dans la phase liquide n'était pas pris en compte. En outre, les récipients utilisés étaient très petits (20 ml) et ne contenaient que 10 ml de milieu, ce qui engendrait des problèmes, par exemple lorsqu'on ajoutait des quantités forcément très petites de substances d'essai insolubles, et/ou du fait que le milieu inoculé risquait de ne pas renfermer (suffisamment) de micro-organismes capables de dégrader les substances d'essai.

6. Ces problèmes ont été résolus par les études indépendantes de Struijs et Stoltenkamp (13) et de Birch et Fletcher (14), ces derniers s'étant inspirés de leur expérience avec les appareils utilisés dans l'essai de biodégradation anaérobie (15). Dans la première méthode (13), le CO_2 est mesuré dans l'espace de tête après acidification et équilibrage, tandis que dans la seconde (14), le carbone inorganique dissous est mesuré dans les phases gazeuse et liquide, sans traitement; plus de 90 % du carbone inorganique formé était présent dans la phase liquide. Ces deux méthodes présentent des avantages sur l'essai de Sturm du fait que le système expérimental est plus compact et maniable, qu'elles s'appliquent aussi aux substances volatiles et que le risque de retard dans la mesure du CO_2 produit est écarté.

7. Ces deux approches ont été combinées dans la norme ISO (essai au CO_2 – espace de tête) (16) qui a fait l'objet d'un essai circulaire (17) et qui forme la base de la présente méthode d'essai. Ces deux approches ont également été appliquées dans la méthode de l'US EPA (18). Deux méthodes de mesure du CO_2 ont été recommandées, à savoir le CO_2 dans l'espace de tête après acidification (13) et le carbone inorganique dans la phase liquide après l'ajout d'un excès de base. Cette dernière méthode a été introduite par Peterson au cours de l'essai circulaire, conduit par le CONCAWE (19), de cette méthode de l'espace de tête modifiée pour mesurer la biodégradabilité intrinsèque. Les changements apportés par la révision effectuée en 1992 (20) des méthodes contenues dans le chapitre C.4 de la présente annexe pour les essais de biodégradabilité facile ont été incorporés dans la présente méthode d'essai, si bien que les conditions (milieu, durée, etc.) sont par ailleurs identiques à celles de l'essai modifié de Sturm (20). Birch et Fletcher (14) ont montré que, sur les mêmes substances, l'essai de l'espace de tête livrait des résultats très proches de ceux de l'essai circulaire organisé par l'OCDE des méthodes d'essai révisées (21).

PRINCIPE DE L'ESSAI

8. Une population mixte de micro-organismes est ensemencée dans un milieu tampon composé de sels minéraux, où la substance d'essai, généralement à une concentration de 20 mg C/l, représente la seule source de carbone et d'énergie. L'essai est conduit dans des flacons hermétiquement clos comportant un espace de tête d'air, qui sert de réserve d'oxygène pour la biodégradation aérobie. On détermine le CO_2 dégagé par la biodégradation aérobie finale de la substance d'essai en mesurant l'excédent de carbone inorganique produit dans les flacons d'essai par rapport au carbone inorganique produit dans les flacons témoins à blanc ne renfermant que le milieu ensemencé. Le degré de biodégradation est exprimé en pourcentage de la production maximale théorique de carbone inorganique (ThCI), d'après la quantité de substance d'essai (en carbone organique) ajoutée au départ.

9. La disparition de carbone organique dissous et/ou le niveau de la biodégradation primaire de la substance d'essai peuvent aussi être mesurés (20).

▼M4

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

10. Il faut connaître la teneur (% poids) en carbone organique de la substance d'essai, d'après sa structure chimique ou par une mesure, de façon à pouvoir calculer le pourcentage de dégradation. Dans le cas des substances d'essai volatiles, il est utile de mesurer ou de calculer la constante de Henry afin de déterminer un rapport volumique espace de tête/liquide approprié. Les informations sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes permettent de choisir une concentration d'essai appropriée et facilitent l'interprétation des résultats lorsque la biodégradabilité est faible: on recommande d'inclure un témoin d'inhibition, sauf si l'on sait que la substance d'essai n'inhibe pas l'activité des micro-organismes (voir paragraphe 24).

CHAMP D'APPLICATION DE LA MÉTHODE

11. Cet essai convient aux substances insolubles et solubles dans l'eau, cependant la substance d'essai doit être bien dispersée. Si l'on applique le rapport volumique espace de tête/liquide recommandé de 1/2, les substances volatiles dont la constante de Henry ne dépasse pas 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$ peuvent être testées puisque la proportion de la substance d'essai dans l'espace de tête n'excèdera pas 1 % (13). Un volume plus petit d'espace de tête peut être utilisé pour tester des substances plus volatiles, mais dont la biodisponibilité risque d'être limitante, surtout si elles sont peu solubles dans l'eau. Toutefois, les expérimentateurs doivent s'assurer que le rapport volumique espace de tête/liquide et la concentration de la substance d'essai laissent suffisamment d'oxygène disponible pour permettre à la biodégradation aérobie d'être complète (en évitant, par exemple, d'utiliser un substrat très concentré et un petit espace de tête). Des orientations sur ce point figurent dans les références (13) et (23).

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

12. Il faut vérifier le procédé expérimental en testant en parallèle une substance de référence de biodégradabilité connue. À cet effet, l'aniline, le benzoate de sodium ou l'éthylèneglycol peuvent être utilisés pour les substances d'essai solubles dans l'eau et le 1-octanol pour les substances d'essai peu solubles (13). La biodégradation de ces substances doit être supérieure à 60 % de la ThCI au bout de 14 jours.

REPRODUCTIBILITÉ

13. L'essai circulaire réalisé par l'ISO de la méthode (17) a produit les résultats suivants, pour les conditions recommandées, notamment une concentration de la substance d'essai de 20 mg C/l:

Substance d'essai	Pourcentage moyen de biodégradation (28 jours)	Coefficient de variation (%)	Nombre de laboratoires
Aniline	90	16	17
1-octanol	85	12	14

Avec l'aniline, la variabilité interne de l'essai était faible, les coefficients de variabilité ne dépassant pas 5 % dans presque tous les essais. Dans les deux cas où la répétabilité a été moins bonne, la plus grande variabilité a probablement été due à une production élevée de carbone inorganique dans les témoins à blanc. Le 1-octanol a donné lieu à une moins bonne répétabilité, mais avec une variabilité néanmoins inférieure à 10 % dans 79 % des essais. Cette plus grande variabilité interne de l'essai pourrait résulter d'erreurs de dosage, le volume de 1-octanol à injecter dans les flacons expérimentaux hermétiquement clos étant faible (3 à 4 µl). Des concentrations plus faibles de la substance d'essai engendreraient des coefficients de variation plus élevés, en particulier aux concentrations inférieures à 10 mg C/l. Ce problème pourrait être en partie résolu par la diminution de la concentration du carbone inorganique total dans l'inoculum.

▼M4

14. Un essai circulaire de cinq agents tensioactifs à 10 mg C/L, organisé par l'Union européenne (24), a livré les résultats suivants:

Substance d'essai	Pourcentage moyen de biodégradation (28 jours)	Coefficient de variation (%)	Nombre de laboratoires
Benzènesulfonate de tétrapropylène	17	45	10
Diisooctylsulfosuccinate (anionique)	72	22	9
Chlorure d'ammonium hexadécyl-triméthyique (*) (cationique)	75	13	10
(éthoxylate d')$_9$ isononylphénol (non ionique)	41	32	10
Cocoamidepropyl- diméthylhydroxy- sulfobétaïne (amphotère)	60	23	11

(*) Le SiO_2 a été ajouté pour neutraliser la toxicité.

Les résultats montrent qu'en général, les agents tensioactifs les moins bien dégradés présentent une plus grande variabilité. La variabilité interne de l'essai, qui était inférieure à 15 % dans plus de 90 % des cas, n'a pas dépassé 30-40 %.

Note: la plupart des agents tensioactifs ne se composent pas d'une seule espèce moléculaire, mais sont des mélanges d'isomères, d'homologues, etc. qui se dégradent à l'issue de différentes périodes de latence et à différentes vitesses, et qui génèrent des courbes «brouillées», atténuées, de sorte que le seuil de 60 % risque de n'être pas atteint dans la fenêtre de dix jours, même si chaque espèce moléculaire atteindrait plus de 60 % en l'espace de dix jours si elle avait été testée isolément. Ce phénomène peut aussi s'observer avec d'autres mélanges complexes.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

15. Appareils courants de laboratoire et:

a) flacons à sérum en verre fermés avec des bouchons en caoutchouc butylique sertis de surcapsules en aluminium. La capacité recommandée est de 125 ml, soit un volume total d'environ 160 ml (dans ce cas, le volume de chaque flacon doit atteindre 160 ml avec une précision de 1 ml). Des flacons plus petits peuvent être utilisés si les résultats remplissent les conditions décrites aux paragraphes 66 et 67;

b) analyseur de carbone ou autre instrument (chromatographe en phase gazeuse, par exemple) pour mesurer le carbone inorganique;

▼M4

c) seringues à haute précision pour les échantillons gazeux et liquides;

d) agitateur orbital dans un environnement thermostaté;

e) source d'air exempt de CO_2 – on peut la préparer en faisant passer l'air à travers des granules de chaux sodée ou en utilisant un mélange gazeux à 80 % de N_2 et 20 % d'O_2 (facultatif) (voir paragraphe 28);

f) appareil à membrane filtrante à pores de 0,20 à 0,45 μm (facultatif);

g) analyseur de carbone organique (facultatif).

Réactifs

16. Tous les réactifs doivent être de qualité pour analyse.

Eau

17. On utilise de l'eau distillée ou désionisée dont la teneur en carbone organique total est ≤ 1 mg/l. Cela représente une quantité ≤ 5 % de la teneur initiale en carbone organique introduite par la dose recommandée de substance d'essai.

Solutions mères pour le milieu composé de sels minéraux

18. Les solutions mères et le milieu minéral sont similaires à ceux de la norme ISO 14593 (16) et des essais de «biodégradabilité facile» du chapitre C.4 (20). L'utilisation d'une concentration plus élevée de chlorure d'ammonium (2,0 g/l au lieu de 0,5 g/l) ne devrait être nécessaire que dans des cas très exceptionnels, par exemple lorsque la concentration de la substance d'essai est > 40 mg C/l. Les solutions mères doivent être gardées au froid et éliminées après six mois, ou avant si l'on remarque une précipitation ou une prolifération bactérienne. Préparer les solutions mères suivantes:

a) Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) 8,50 g

Hydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4) 21,75 g

Hydrogénophosphate de sodium dihydraté ($Na_2HPO_4.2H_20$) 33,40 g

Chlorure d'ammonium (NH_4Cl) 0,50 g

Dissoudre dans l'eau et porter le volume à 1 litre. Le pH de la solution doit être égal à 7,4 (± 0,2). Si ce n'est pas le cas, préparer une autre solution;

b) Chlorure de calcium dihydraté ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40 g

Dissoudre dans l'eau et porter le volume à 1 litre;

c) Sulfate de magnésium heptahydraté ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50 g

Dissoudre dans l'eau et porter le volume à 1 litre;

d) Chlorure de fer (III) hexahydraté ($FeCl_3.6H_20$) 0,25 g

Dissoudre dans l'eau, porter le volume à 1 litre et ajouter une goutte de HCl concentré.

Préparation du milieu minéral

19. Mélanger 10 ml de la solution a) avec environ 800 ml d'eau (paragraphe 17), puis ajouter 1 ml des solutions b), c) et d) et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau (paragraphe 17).

Autres réactifs

20. Acide phosphorique concentré (H_3PO_4) (> 85 % masse par volume).

▼M4

Solution d'hydroxyde de sodium 7M

21. Dissoudre 280 g d'hydroxyde de sodium (NaOH) dans 1 litre d'eau (paragraphe 17). Déterminer la teneur en carbone inorganique dissous de cette solution et tenir compte de cette valeur dans le calcul du résultat de l'essai (voir paragraphes 55 et 61), notamment en fonction du critère de validité mentionné au paragraphe 66 b). Préparer une nouvelle solution si la concentration en carbone inorganique dissous est trop élevée.

Substance d'essai

22. Préparer une solution mère d'une substance d'essai suffisamment hydrosoluble, dans l'eau (paragraphe 17) ou dans le milieu d'essai (paragraphe 19), à une concentration de préférence 100 fois supérieure à la concentration finale à utiliser dans l'essai; il peut être nécessaire d'ajuster le pH de la solution mère. La solution mère doit être ajoutée au milieu minéral de telle sorte que la concentration finale de carbone organique atteigne entre 2 et 40 mg C/l, de préférence 20 mg C/l. Des concentrations plus faibles que celles mentionnées ci-dessus risquent de diminuer la précision. Les substances liquides solubles et insolubles peuvent être introduites directement dans les récipients à l'aide de seringues à haute précision. Les substances d'essai peu solubles et insolubles peuvent requérir un traitement spécial (25), à choisir parmi les suivants:

a) ajout direct de quantités de poids connu;

b) dispersion aux ultrasons avant l'ajout;

c) dispersion à l'aide d'agents émulsifiants dont il y a lieu d'établir, avant d'ajouter la substance d'essai, s'ils exercent une action inhibitrice ou stimulante sur l'activité microbiologique;

d) adsorption des substances d'essai liquides, ou d'une solution de la substance d'essai dans un solvant volatil approprié, sur un milieu ou un support inerte (par exemple un filtre en fibres de verre), suivie par l'évaporation du solvant, le cas échéant, et ajout direct de quantités connues;

e) ajout d'un volume connu d'une solution de la substance d'essai dans un solvant suffisamment volatil pour qu'il s'évapore complètement du récipient, suivi par l'évaporation du solvant.

Il faut vérifier par un essai si les agents ou les solvants utilisés aux points c), d) et e) ont un effet stimulant ou inhibiteur sur l'activité microbiologique [voir paragraphe 42 b)].

Substance de référence

23. Préparer une solution mère de la substance de référence (soluble) dans l'eau (paragraphe 17) à une concentration de préférence 100 fois supérieure à la concentration finale (20 mg C/l) à utiliser dans l'essai.

Vérification de l'inhibition

24. Il arrive souvent que les substances d'essai ne se dégradent pas de façon significative dans les conditions appliquées aux évaluations de la biodégradation immédiate. Cela peut résulter du fait que la substance d'essai exerce un effet inhibiteur sur l'inoculum à la concentration à laquelle elle est testée. Une vérification de l'effet inhibiteur peut être incluse dans la conception de l'essai pour faciliter l'identification (rétrospective) de l'inhibition comme l'une des causes possibles ou l'un des facteurs contributifs, soit, au contraire, pour éliminer cette possibilité d'interférences, ce qui démontrerait que la dégradation faible ou nulle n'est imputable qu'au fait que les micro-organismes n'attaquent pas la substance dans les conditions de l'essai. Afin d'obtenir des informations sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes (aérobies), on prépare une solution contenant la substance d'essai et la substance de référence dans le milieu d'essai (paragraphe 19), chacune à la même concentration que celle à laquelle elles ont été ajoutées dans le milieu d'essai lors de l'essai (voir paragraphes 22 et 23).

▼M4

Inoculum

25. L'inoculum peut provenir de différentes sources: boues activées, effluents d'eaux usées (non chlorés); eaux de surface et sols; ou d'un mélange de ces milieux (20). Il convient de vérifier l'activité biodégradante de la source à l'aide d'une substance de référence. Quelle que soit la source, il ne faut pas utiliser de micro-organismes ayant déjà été exposés à la substance d'essai pour l'essai de biodégradabilité facile.

Attention: les boues activées, les eaux usées et les effluents d'eaux usées renferment des organismes pathogènes et doivent être manipulés avec précaution.

26. On sait empiriquement que le volume optimal de l'inoculum est celui qui:

— suffit pour fournir une activité biodégradante adéquate,

— dégrade la substance de référence dans le pourcentage stipulé (voir paragraphe 66),

— fournit 10^2 à 10^5 unités formant colonie par millilitre dans le mélange final,

— donne normalement une concentration de 4 mg/l de solides en suspension dans le mélange final lorsqu'on utilise de la boue activée; des concentrations allant jusqu'à 30 mg/l peuvent être utilisées, mais elles risquent d'augmenter sensiblement la production de CO_2 dans les témoins à blanc (26),

— représente moins de 10 % de la concentration initiale de carbone organique introduite par la substance d'essai,

— équivaut généralement à 1 à 10 ml d'inoculum par litre de solution expérimentale.

Boues activées

27. Prélever un échantillon de boue activée dans le bassin d'aération d'une station d'épuration ou d'une installation à l'échelle du laboratoire traitant principalement des eaux usées domestiques. Éliminer, si nécessaire, les grosses particules à l'aide d'un tamis (possédant des orifices de 1 mm^2, par exemple) et conserver ensuite la boue en aérobiose jusqu'à son utilisation.

28. Une autre possibilité consiste, après avoir éliminé toutes les grosses particules, à laisser décanter la boue ou à la centrifuger (par exemple à 1 100 g pendant 10 minutes). Éliminer le surnageant. La boue peut être lavée dans la solution minérale. Suspendre la boue concentrée dans le milieu minéral de façon à obtenir une concentration de 3 à 5 g/l de matières en suspension. Aérer ensuite la suspension jusqu'à son utilisation.

29. La boue doit provenir d'une station d'épuration ordinaire en bon état de fonctionnement. Les boues issues d'une station d'épuration dont le débit est important, ainsi que les boues susceptibles de contenir des inhibiteurs, doivent être lavées. Décanter ou centrifuger la boue remise en suspension après agitation vigoureuse, éliminer le liquide surnageant et resuspendre la boue lavée dans un volume de milieu minéral frais. Répéter cette opération jusqu'à ce que la boue puisse être considérée comme exempte de substrat en excès ou d'inhibiteur.

30. Prélever un échantillon de boue remise en suspension (lorsque la resuspension est complète) ou de boue non traitée juste avant le moment de son utilisation afin de déterminer le poids sec des matières en suspension.

31. Une autre possibilité consiste à homogénéiser la boue activée (entre 3 et 5 g/l de solides en suspension). Passer la boue dans un mélangeur mécanique réglé sur une vitesse moyenne pendant 2 minutes. Laisser reposer la boue homogénéisée pendant 30 minutes, ou plus longtemps si nécessaire, et prélever la phase liquide, qui sera utilisée comme inoculum à raison d'environ 10 ml par litre de milieu minéral.

▼M4

32. Il est possible d'obtenir une réduction plus importante du dégagement de CO_2 dans le témoin à blanc en aérant la boue toute une nuit avec de l'air exempt de CO_2. Dans cet essai, la concentration de l'inoculum doit s'élever à 4 mg/l de solides de boue activée (13).

Effluent secondaire d'eaux usées

33. L'inoculum peut également provenir de l'effluent secondaire d'une station d'épuration ou d'une installation à l'échelle du laboratoire recevant principalement des eaux usées domestiques. Conservé en aérobiose, l'échantillon sera utilisé le jour de son prélèvement ou préconditionné si nécessaire. L'effluent doit être filtré à travers un filtre grossier et son pH est mesuré.

34. Pour réduire la teneur en carbone inorganique du filtrat, on fait barboter dans celui-ci de l'air exempt de CO_2 [paragraphe 15 e)] durant 1 heure tout en maintenant le pH à 6,5 avec de l'acide phosphorique (paragraphe 20). La valeur du pH est ramenée à sa valeur de départ avec de l'hydroxyde de sodium (paragraphe 21) et on laisse reposer le filtrat pendant environ 1 heure, avant d'y prélever un volume approprié de surnageant pour l'inoculation. Ce processus de barbotage diminue la teneur de l'inoculum en carbone inorganique. Par exemple, si on utilise le volume maximal recommandé d'effluent filtré et barboté (100 ml) par litre comme inoculum, la quantité de carbone inorganique présente dans les flacons témoins à blanc est comprise entre 0,4 et 1,3 mg/l (14), ce qui représente 2 à 6,5 % du carbone de la substance d'essai à 20 mg C/l et 4 à 13 % à 10 mg C/l.

Eaux de surface

35. Dans une eau de surface adéquate, on prélève un échantillon qui sera conservé en aérobiose et utilisé le jour même. Si nécessaire, l'échantillon est concentré par filtration ou centrifugation. Le volume d'inoculum à utiliser dans chaque récipient expérimental doit satisfaire aux critères énoncés au paragraphe 26.

Sols

36. Prélever un échantillon dans un sol approprié à une profondeur allant jusqu'à 20 cm en dessous de la surface du sol. Il convient d'enlever les pierres, les débris végétaux et les invertébrés de l'échantillon de sol avant de le passer au travers d'un tamis pourvu d'orifices de 2 mm (si l'échantillon est trop mouillé pour pouvoir être tamisé immédiatement, on le sèche partiellement à l'air). Il faut le garder en aérobiose et l'utiliser le jour même (si l'échantillon est transporté dans un sac noir de polythène fermé de manière non hermétique, il peut être conservé à 2 à 4 °C dans ce sac jusqu'à un mois).

Préconditionnement de l'inoculum

37. L'inoculum peut être préconditionné aux conditions expérimentales, mais non préadapté à la substance d'essai. Le préconditionnement peut diminuer le dégagement de CO_2 dans le témoin à blanc. Le préconditionnement consiste à aérer la boue activée, après l'avoir diluée dans le milieu expérimental à 30 mg/l, avec de l'air humide exempt de CO_2 durant 5 à 7 jours à la température de l'essai.

MODE OPÉRATOIRE

Nombre de flacons

38. Le nombre de flacons [paragraphe 15 a)] requis pour un essai dépendra de la fréquence des analyses et de la durée de l'essai.

39. On recommande d'analyser les flacons en trois exemplaires, après un nombre suffisant d'intervalles de temps pour pouvoir identifier la fenêtre des dix jours. On analyse également au moins cinq flacons expérimentaux [paragraphe 15 a)] des séries a), b) et c) (voir paragraphe 42) à la fin de l'essai, afin de pouvoir calculer les intervalles de confiance à 95 % pour le pourcentage moyen de biodégradation.

▼M4

Milieu ensemencé

40. L'inoculum est utilisé à une concentration de 4 mg/l en solides secs de boue activée. Juste avant l'utilisation, préparer une quantité suffisante de milieu ensemencé en ajoutant, par exemple, 2 ml de boue activée traitée comme il convient (paragraphes 27 à 32) à une concentration de 2 000 mg/l à 1 litre de milieu minéral (paragraphe 19). Si l'on utilise un effluent secondaire d'eaux usées, ajouter jusqu'à 100 ml d'effluent (paragraphe 33) à 900 ml de milieu minéral (paragraphe 19) et porter à 1 litre avec du milieu.

Préparation des flacons

41. Verser des aliquotes de milieu ensemencé dans des flacons identiques en plusieurs exemplaires, de telle sorte que le rapport espace de tête/liquide soit de 1/2 (introduire, par exemple 107 ml dans des flacons de 160 ml de capacité). D'autres rapports peuvent être appliqués, mais il faut tenir compte de l'avertissement donné au paragraphe 11. Quel que soit le type d'inoculum utilisé, on veillera à mélanger correctement le milieu ensemencé pour qu'il se répartisse uniformément dans les flacons d'essai.

42. Préparer des séries de flacons [paragraphe 15 a)] destinés aux usages suivants:

a) flacons d'essai (F_T) contenant la substance d'essai;

b) flacons témoins à blanc (F_B) ne contenant que le milieu expérimental et l'inoculum; tous les produits chimiques, solvants, agents ou filtres en fibres de verre utilisés pour introduire la substance d'essai dans les récipients expérimentaux doivent aussi y être ajoutés;

c) flacons contenant la substance de référence (F_C) pour vérifier le procédé;

d) si nécessaire, flacons (F_I) pour vérifier un éventuel effet inhibiteur de la substance d'essai contenant à la fois la substance d'essai et la substance de référence aux mêmes concentrations (paragraphe 24) que dans les flacons F_T et F_C respectivement;

e) flacons (F_S) pour vérifier une éventuelle dégradation abiotique; il s'agit des flacons (F_T) auxquels on a ajouté 50 mg/l de $HgCl_2$ ou qu'on a stérilisés d'une autre manière (à l'autoclave, par exemple).

43. Les substances d'essai et de référence solubles dans l'eau sont ajoutées aux flacons sous la forme de leurs solutions mères aqueuses (paragraphes 22, 23 et 24), de manière à fournir une concentration de 10 à 20 mg C/l.

44. Les substances d'essai et de référence insolubles sont ajoutées aux flacons de différentes façons [voir paragraphe 22 a) à e)] en fonction de la nature de la substance, avant ou après l'ajout du milieu ensemencé, selon la méthode de traitement de la substance. Si l'on utilise l'une des procédures exposées au paragraphe 22 a) à e), les flacons témoins à blanc (F_B) [paragraphe 42 b)] doivent être traités de manière identique, si ce n'est qu'ils ne contiendront ni la substance d'essai ni la substance de référence.

45. Les substances d'essai volatiles doivent être introduites dans des flacons hermétiquement clos (paragraphe 47) au moyen d'une microseringue. La dose est calculée en fonction du volume injecté et de la densité de la substance.

46. Si nécessaire, on ajoutera de l'eau aux flacons, afin que le volume de liquide soit identique dans tous les flacons. On s'assurera que le rapport espace de tête/liquide (généralement de 1/2) et la concentration de la substance d'essai sont tels que l'espace de tête renferme suffisamment d'oxygène pour permettre une biodégradation totale.

▼M4

47. Tous les flacons sont ensuite fermés hermétiquement, par exemple au moyen de bouchons en caoutchouc butylique et de surcapsules en aluminium. Les substances d'essai volatiles doivent être ajoutées à ce stade (paragraphe 45). S'il y a lieu de mesurer la baisse de concentration du carbone organique dissous dans la solution expérimentale et d'analyser au temps zéro la concentration initiale de carbone inorganique ou d'autres paramètres [témoins stériles, paragraphe 42 e)], on prélève un échantillon approprié du flacon d'essai. Le flacon d'essai et son contenu sont ensuite éliminés.

48. Les flacons hermétiquement clos sont placés sur un agitateur rotatif [paragraphe 15 d)], réglé sur une vitesse d'agitation suffisante pour que le contenu du flacon reste bien mélangé et en suspension (par exemple 150 à 200 tpm), et mis à incuber dans l'obscurité à température constante (20 °C ± 1 °C).

Prélèvement

49. Le programme de prélèvement dépendra de la période de latence et de la vitesse de biodégradation de la substance d'essai. Des flacons sont retirés définitivement du dispositif expérimental afin d'être analysés le jour du prélèvement, lequel intervient au moins une fois par semaine ou plus fréquemment (par exemple deux fois par semaine), si une courbe de dégradation complète est requise. On retire le nombre nécessaire de flacons identiques de l'agitateur dans chaque catégorie: F_T, F_B et F_C et, le cas échéant F_I et F_S (voir paragraphe 42). L'essai dure normalement 28 jours. Si la courbe de biodégradation atteint un plateau avant 28 jours, l'essai peut s'arrêter avant 28 jours. Prélever des échantillons dans les cinq flacons réservés aux analyses à effectuer le 28^{e} jour et utiliser les résultats pour calculer les limites de confiance ou le coefficient de variation du pourcentage de biodégradation. Les flacons destinés à vérifier l'inhibition et la dégradation abiotique ne doivent pas faire l'objet de prélèvements aussi fréquents que les autres flacons; il suffira de deux prélèvements effectués respectivement le 1er jour et le 28^{e} jour.

Analyse du carbone inorganique

50. On détermine la production de CO_2 dans les flacons en mesurant l'augmentation de la concentration de carbone inorganique durant l'incubation. Deux méthodes, décrites ci-après, sont recommandées pour mesurer la quantité de carbone inorganique produite durant l'essai. Au cours d'un même essai, il ne faudra utiliser qu'une seule méthode, car ces méthodes risquent de donner des résultats légèrement différents.

51. On recommande la méthode (a) si le milieu est susceptible de contenir des résidus, par exemple de papier filtre en verre et/ou d'une substance d'essai insoluble. Cette analyse peut être pratiquée au moyen d'un chromatographe en phase gazeuse, à défaut d'un analyseur de carbone. Il est important de maintenir les flacons à une température assez proche de la température de l'essai durant l'analyse du gaz de l'espace de tête. La méthode (b) peut s'avérer plus facile à appliquer par les laboratoires qui mesurent le carbone inorganique à l'aide d'un analyseur de carbone. Il importe que la solution d'hydroxyde de sodium (paragraphe 21) utilisée pour convertir le CO_2 en carbonate soit fraîchement préparée ou que sa teneur en carbone inorganique soit connue, de telle sorte que ce paramètre puisse être pris en compte lors du calcul des résultats de l'essai [voir paragraphe 66 b)].

Méthode (a): acidification à pH < 3

52. Avant chaque lot d'analyses, l'analyseur de carbone inorganique est étalonné au moyen d'un étalon de carbone inorganique approprié (par exemple une dilution 1 % poids/poids de CO_2 dans du N_2). Injecter de l'acide phosphorique concentré (paragraphe 20) à travers le bouchon de chaque flacon destiné à un prélèvement, afin d'abaisser le pH du milieu à une valeur < 3 (ajouter, par exemple, 1 ml à 107 ml de milieu expérimental). Remettre les flacons sur l'agitateur. Après avoir subi une agitation d'une heure à la température expérimentale, les flacons sont retirés de l'agitateur. On prélève des aliquotes de gaz (1 ml, par exemple) dans l'espace de tête de chaque flacon et on les injecte dans l'analyseur de carbone inorganique. Les concentrations de carbone inorganique mesurées sont notées en mg C/l.

▼M4

53. Cette méthode repose sur le principe suivant lequel après l'acidification à pH < 3 et l'équilibrage à 20 °C, la constante d'équilibre de la répartition du CO_2 entre les phases liquide et gazeuse des flacons d'essai est égale à 1,0 lorsqu'elle est mesurée sous forme de concentration (13). Cette relation doit être démontrée au moins une fois pour le système expérimental, de la façon suivante:

Préparer des flacons contenant 5 et 10 mg/l de carbone inorganique à l'aide d'une solution de carbonate de sodium anhydre (Na_2CO_3) dans de l'eau exempte de CO_2 [préparer cette eau en l'acidifiant à pH 6,5 avec de l'acide phosphorique concentré (paragraphe 20), en y faisant barboter de l'air exempt de CO_2 toute une nuit et en ramenant le pH à une valeur neutre avec un produit alcalin]. S'assurer que le rapport volumique espace de tête/liquide est le même que dans les essais (1/2, par exemple). Acidifier et équilibrer comme indiqué au paragraphe 52 et mesurer les concentrations de carbone inorganique dans l'espace de tête et dans la phase liquide. Vérifier que les deux concentrations sont identiques, à l'erreur expérimentale près. Si elles ne le sont pas, l'expérimentateur devra réexaminer les procédures. Il n'est pas nécessaire de vérifier la répartition du carbone inorganique entre les phases liquide et gazeuse à chaque essai; cette vérification pourrait être effectuée au cours de l'étalonnage

54. S'il y a lieu de mesurer la disparition de carbone organique dissous (substances d'essai hydrosolubles uniquement), des échantillons sont prélevés dans la phase liquide de flacons séparés (non acidifiés), filtrés sur une membrane et injectés dans l'analyseur de carbone organique dissous. Ces flacons peuvent servir à d'autres analyses, si nécessaire, permettant de mesurer la biodégradation primaire.

Méthode (b): conversion du CO_2 en carbonate

55. Avant chaque lot d'analyses, l'analyseur de carbone inorganique est étalonné au moyen d'un étalon adéquat, par exemple une solution de bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$) dans de l'eau exempte de CO_2 (voir paragraphe 53), à une concentration de 0 à 20 mg de carbone inorganique/litre. Injecter une solution d'hydroxyde de sodium (7M, paragraphe 21) (par exemple à raison d'1 ml pour 107 ml de milieu) à travers le bouchon de chaque flacon destiné à un prélèvement et agiter les flacons durant une heure à la température de l'essai. On utilise la même solution de NaOH dans tous les flacons retirés définitivement un jour donné, mais pas nécessairement pour tous les prélèvements effectués tout au long de l'essai. Si les valeurs absolues de la teneur en carbone inorganique des témoins à blanc sont requises à chaque prélèvement, il faudra déterminer la teneur en carbone inorganique de la solution de NaOH chaque fois qu'elle est utilisée. Enlever les flacons de l'agitateur et laisser reposer. Extraire un volume approprié (50 à 1 000 µl, par exemple) de la phase liquide de chaque flacon à l'aide d'une seringue. Injecter les échantillons dans l'analyseur de carbone inorganique et enregistrer les concentrations de carbone inorganique. On s'assurera que l'analyseur employé se prête au traitement des échantillons alcalins obtenus par cette méthode.

56. Cette méthode repose sur le principe selon lequel après l'ajout d'une solution alcaline et agitation, la concentration de carbone inorganique dans l'espace de tête est négligeable. Cela doit être vérifié au moins une fois pour le système expérimental. Il faut, pour ce faire, utiliser des étalons de carbone inorganique, ajouter une solution basique et équilibrer, et mesurer la concentration de carbone inorganique dans l'espace de tête et dans la phase liquide (voir paragraphe 53). La concentration dans l'espace de tête devrait avoisiner zéro. Il n'est pas nécessaire de vérifier cette absorption pratiquement complète de CO_2 à chaque essai.

57. Si la disparition de carbone organique dissous (substances d'essai hydrosolubles uniquement) est à mesurer, des échantillons sont prélevés dans la phase liquide de flacons séparés (ne contenant pas de produit alcalin ajouté), filtrés sur une membrane et injectés dans l'analyseur de carbone organique dissous. Ces flacons peuvent servir à d'autres analyses, si nécessaire, pour mesurer la biodégradation primaire.

▼M4

RÉSULTATS ET RAPPORT

Calcul des résultats

58. En supposant que la substance d'essai a été minéralisée à 100 % en CO_2, la production maximale théorique de carbone inorganique (ThCI) des flacons d'essai excédant celle des témoins à blanc est égale au carbone organique total (COT) ajouté dans chaque flacon d'essai au début de l'essai, autrement dit:

$$ThCI = COT$$

La masse totale (mg) de carbone inorganique (CIT) dans chaque flacon est:

$$CIT = (\text{mg de C dans le liquide} + \text{mg de C dans l'espace de tête}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad \text{Équation [1]}$$

où:

V_L = volume de liquide dans le flacon (litre);

C_L = concentration de carbone inorganique dans le liquide (carbone en mg/l);

V_H = volume de l'espace de tête (litre);

C_H = concentration de carbone inorganique dans l'espace de tête (carbone en mg/l).

Les calculs du CIT pour les deux méthodes analytiques utilisées pour mesurer le carbone inorganique dans cet essai sont décrits ci-dessous aux paragraphes 60 et 61. Le pourcentage de biodégradation (% D) dans chaque cas est donné par l'équation suivante:

$$\%D = \frac{(CIT_t - CIT_b)}{COT} \times 100 \quad \text{Équation [2]}$$

où:

CIT_t = mg de CIT dans le flacon d'essai au temps t;

CIT_b = la moyenne des mg de CIT dans les flacons témoins à blanc au temps t;

COT = mg de COT ajoutés initialement au flacon d'essai.

Le pourcentage de biodégradation (% D) est calculé pour les flacons d'essai (F_T) et de référence (F_C) et, le cas échéant, les flacons (F_I) destinés à la vérification d'un éventuel effet inhibiteur, à partir des quantités respectives de carbone inorganique total produites jusqu'à chaque temps de prélèvement.

59. Une augmentation significative de la teneur en CIT dans les témoins stériles (F_S) durant l'essai permet de conclure à une dégradation abiotique de la substance d'essai et il faut en tenir compte dans le calcul de D dans l'équation [2].

Acidification à pH < 3

60. L'acidification à pH < 3 et l'équilibrage entraînant l'égalisation de la concentration de CIT entre les phases liquide et gazeuse, seule la concentration de carbone inorganique dans la phase gazeuse doit être mesurée. Aussi, d'après l'équation [1], $CIT = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, où V_B = est le volume du flacon de sérum.

Conversion du CO_2 en carbonate

61. Dans cette méthode, les calculs sont effectués conformément à l'équation [1], mais la quantité négligeable de carbone inorganique dans la phase gazeuse est ignorée, de sorte que $V_H \times C_H = 0$, et $CIT = V_L \times C_L$.

▼M4

Expression des résultats

62. On trace une courbe de biodégradation en reportant le pourcentage de biodégradation, D, en fonction du temps d'incubation, courbe qui indiquera, si possible, la phase de latence, la phase de biodégradation, la fenêtre des dix jours et la phase plateau, c'est-à-dire la phase durant laquelle la dégradation a atteint son maximum et où la courbe de biodégradation marque un palier. Si des résultats comparables sont obtenus pour les flacons d'essai (F_T) testés en parallèle (< 20 % de différence), on trace une courbe moyenne (voir appendice 2, figure 1); dans le cas contraire, on trace une courbe pour chaque flacon d'essai. On détermine la valeur moyenne du pourcentage de biodégradation dans la phase plateau ou on évalue sa valeur maximale (par exemple si la courbe fléchit dans la phase plateau), mais il est important d'estimer si, dans ce dernier cas, la valeur n'est pas nettement divergente. Ce niveau maximal de biodégradation doit être mentionné en tant que «degré de biodégradation de la substance d'essai» dans le rapport d'essai. Si le nombre de flacons d'essai s'est avéré insuffisant pour préciser une phase plateau, on utilise les données mesurées du dernier jour de l'essai pour calculer une valeur moyenne. Cette dernière valeur, la moyenne de cinq essais identiques, sert à indiquer la précision avec laquelle le pourcentage de biodégradation a été déterminé. La valeur obtenue au terme de la fenêtre des dix jours doit également figurer dans le rapport.

63. Tracer, de la même manière, une courbe pour la substance de référence, F_C, et, le cas échéant, pour la vérification de la dégradation abiotique F_S et pour le contrôle de l'inhibition, F_I.

64. Les quantités de CIT présentes dans les témoins à blanc (F_B) sont consignées, de même que celles présentes dans les flacons F_S, si ces flacons sont inclus dans le système expérimental.

65. Calculer D pour les flacons F_I, d'après le rendement théorique escompté en carbone inorganique provenant uniquement de la substance de référence du mélange. Si, au 28^e jour, $([D_{FC}\,(^1) - DF_I\,(^2)]/D_{FC}) \times 100 > 25$ %, il est permis de supposer que la substance d'essai a inhibé l'activité de l'inoculum, ce qui peut expliquer les faibles valeurs de D_{FT} obtenues dans les conditions de l'essai. Dans ce cas, l'essai pourrait être répété avec une concentration d'essai plus faible, et en réduisant de préférence le carbone inorganique dissous (CID) dans l'inoculum et le CIT formé dans les témoins à blanc, car une diminution de la concentration de la substance d'essai amoindrit la précision de la méthode. Un autre inoculum peut également être utilisé. Si la quantité de CIT dans le flacon F_S (dégradation abiotique) montre une augmentation significative (> 10 %), il se peut qu'une dégradation abiotique ait eu lieu.

Validité des résultats

▼M7

66. La validité d'un essai est établie si:

a) le pourcentage moyen de dégradation dans les flacons F_C contenant la substance de référence est >60 % au 14ème jour de l'incubation; et

b) la quantité moyenne de CIT présente dans les témoins à blancs F_B à la fin de l'essai est < 3 mg C/l.

Si ces limites ne sont pas atteintes, on répétera l'essai avec un inoculum provenant d'une autre source et/ou on révisera les procédures appliquées. Par exemple, si une production élevée de carbone inorganique dans le témoin à blanc pose un problème, il convient de suivre la procédure exposée aux paragraphes 27 à 32.

(1) Le pourcentage de dégradation dans les flacons F_C contenant la substance de référence.
(2) Le pourcentage de dégradation dans les flacons F_I.

▼M4

67. Si la substance d'essai ne fournit pas 60 % de la production maximale théorique de carbone inorganique (ThCI) et qu'il a été démontré qu'elle n'exerce aucun effet inhibiteur (paragraphe 65), l'essai peut être répété avec une concentration accrue d'inoculum (jusqu'à 30 mg/l de boue activée et 100 ml d'effluent/l) ou avec un inoculum provenant d'autres sources, en particulier si la dégradation a atteint une valeur comprise entre 20 et 60 %.

Interprétation des résultats

68. Si une substance d'essai atteint une biodégradation > 60 % de la ThCI dans la fenêtre des dix jours au cours de cet essai, cela démontre qu'elle est facilement biodégradable en aérobiose.

69. Si la valeur de seuil de 60 % de la ThCI n'a pas été atteinte, on mesure le pH du milieu des flacons qui n'ont pas été acidifiés ou alcalinisés; une valeur inférieure à 6,5 pourrait indiquer qu'une nitrification a eu lieu. Dans ce cas, on répète l'essai avec une solution tampon plus concentrée.

Rapport d'essai

70. Dresser un tableau du pourcentage de dégradation (% D) relevé dans chaque flacon d'essai (F_T), de référence (F_C) et, le cas échéant, de vérification de l'inhibition (F_I) pour chaque jour de prélèvement. Si les flacons identiques livrent des résultats comparables, tracer une courbe du % D moyen en fonction du temps. Noter la quantité de carbone inorganique total dans les témoins à blanc (F_B) et dans les témoins stériles (F_S), de même que le carbone organique dissous et/ou d'autres paramètres, ainsi que leur pourcentage de disparition.

71. Déterminer la valeur moyenne du % D dans la phase plateau ou utiliser la valeur maximale si la courbe de biodégradation fléchit dans la phase plateau et rapporter cette valeur en tant que «degré de biodégradation de la substance d'essai». Il importe de vérifier que dans ce dernier cas, la valeur la plus élevée n'est pas nettement divergente.

72. Le rapport d'essai doit mentionner les informations suivantes:

Substance d'essai:

— nom courant, nom chimique, numéro CAS, formule structurale et propriétés physico-chimiques pertinentes,

— pureté (impuretés) de la substance d'essai.

Conditions expérimentales:

— référence à la présente méthode d'essai,

— description du système expérimental utilisé (par exemple, volume du flacon, rapport espace de tête/liquide, méthode d'agitation, etc.),

— ajout de la substance d'essai et de la substance de référence dans le système expérimental: concentration appliquée et quantité de carbone mesurée dans chaque flacon d'essai, et, le cas échéant, solvants utilisés,

— détails sur l'inoculum utilisé, traitement préalable et préconditionnement éventuels,

— température d'incubation,

— validation du principe de l'analyse du carbone inorganique,

— principales caractéristiques de l'analyseur de carbone inorganique employé (et de toute autre méthode d'analyse utilisée),

— nombre de répétitions.

Résultats:

— données brutes et valeurs calculées de la biodégradabilité présentées dans un tableau,

▼M4

— graphique du pourcentage de dégradation en fonction du temps pour les substances d'essai et de référence, phase de latence, phase de dégradation, fenêtre des dix jours et pente,

— pourcentage de disparition au niveau du plateau, à la fin de cet essai et après la fenêtre des dix jours,

— justification en cas de rejet des résultats expérimentaux,

— tout autre fait se rapportant à la procédure utilisée,

— analyse des résultats.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) Chapitre C.4 de la présente annexe Détermination de la biodégradabilité «facile» - Essai de dégagement de CO_2 (Méthode C.4-C).

(2) Sturm R.N. (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A., Oil Chem Soc. 50: 159-167.

(3) Larson R.J. (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153-1161.

(4) Larson R.J., Hansmann M.A. and Bookland E.A. (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195-1210.

(5) ISO 9439 (1990; révisée en 1999). Qualité de l'eau – Évaluation de la biodégradabilité aérobie ultime en milieu aqueux des composés organiques – Essai de dégagement de dioxyde de carbone (Sturm).

(6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(8) Gledhill W.E. (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922-929.

(9) Weytjens D., Van Ginneken I. and Painter H.A. (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801-812.

(10) Ennis D.M. and Kramer A. (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181-185.

(11) Ennis D.M., Kramer A., Jameson C.W., Mazzoccki P.H. and Bailey P.H. (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51-53.

(12) Boatman R.J., Cunningham S.L. and Ziegler D.A. (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233-243.

(13) Struijs J. and Stoltenkamp J. (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204-211.

(14) Birch R.R. and Fletcher R.J. (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507-524.

(15) Birch R.R., Biver C., Campagna R., Gledhill W.E., Pagga U., Steber J., Reust H., and Bontinck W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527-1550.

▼**M4**

(16) ISO 14593, (1999) Qualité de l'eau – Évaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie ultime des composés organiques – Méthode par analyse du carbone inorganique dans des récipients hermétiquement clos (essai au CO_2 – espace de tête).

(17) Battersby N.S. (1997). The ISO headspace $C0_2$ biodegradation test, Chemosphere 34: 1813-1822.

(18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

(19) Battersby N.S., Ciccognani D., Evans M.R., King D., Painter H.A., Peterson D.R. and Starkey M. (1999). An «inherent» biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219-3235.

(20) Chapitre C.4 de la présente annexe, Détermination de la biodégradabilité «facile».

(21) OCDE (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris.

(22) Chapitre C.11 de la présente annexe, Boues activées: essai d'inhibition de la respiration.

(23) Struijs J., Stoltenkamp-Wouterse M.J. and Dekkers A.L.M. (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319-327.

(24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

(25) ISO 10634 (1996) Qualité de l'eau – Lignes directrices pour la préparation et le traitement des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux.

▼M4

Appendice 1

ABRÉVIATIONS ET DÉFINITIONS

CI: carbone inorganique.

$ThCO_2$: production théorique de CO_2 (mg); correspond à la quantité de dioxyde de carbone calculée à partir de la teneur en carbone connue ou mesurée de la substance d'essai, qui doit se dégager lors de la minéralisation complète de celle-ci; également exprimée en mg de dioxyde de carbone dégagé par mg de substance d'essai.

COD: le carbone organique dissous est le carbone organique présent en solution ou qui traverse un filtre à pores de 0,45 micron ou encore qui reste dans le surnageant après une centrifugation de 15 minutes à environ 4 000 g (40 000 m sec^{-2}).

CID: carbone inorganique dissous.

ThCI: production théorique de carbone inorganique.

CIT: carbone inorganique total.

Facilement biodégradable: classification arbitraire des produits chimiques qui ont répondu positivement à certains essais de dépistage spécifiques portant sur la biodégradabilité ultime; du fait de la rigueur de ces essais, on admet que de tels composés se dégraderont rapidement et complètement en milieu aquatique dans des conditions aérobies.

Fenêtre des dix jours: les dix jours qui suivent immédiatement le moment où le taux de biodégradation atteint 10 %.

Biodégradabilité intrinsèque: classification des produits chimiques pour lesquels une biodégradation (primaire ou finale) se manifeste sans ambiguïté au cours d'un quelconque essai de biodégradabilité.

Biodégradation ultime en aérobiose: niveau de dégradation atteint lorsque la totalité de la substance d'essai a été utilisée par des micro-organismes pour produire du dioxyde de carbone, de l'eau, des sels minéraux et de nouveaux constituants cellulaires microbiologiques (biomasse).

Minéralisation: dégradation complète d'un composé organique en CO_2 et en H_2O dans des conditions aérobies, et en CH_4, CO_2 et H_2O dans des conditions anaérobies.

Phase de latence: correspond à la période qui commence au début de l'essai et s'achève au moment où les micro-organismes dégradants se sont acclimatés et/ou adaptés et où le degré de biodégradation d'une substance chimique ou d'une matière organique a atteint un niveau détectable (par exemple 10 % de la biodégradation maximale théorique, ou moins, suivant la précision de la technique de mesure).

Phase de dégradation: correspond à la période qui commence à la fin de la phase de latence et se termine au moment où on atteint 90 % du taux maximal de dégradation.

Phase plateau: phase au cours de laquelle la dégradation atteint sa valeur maximale et où la courbe de biodégradation marque un palier.

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

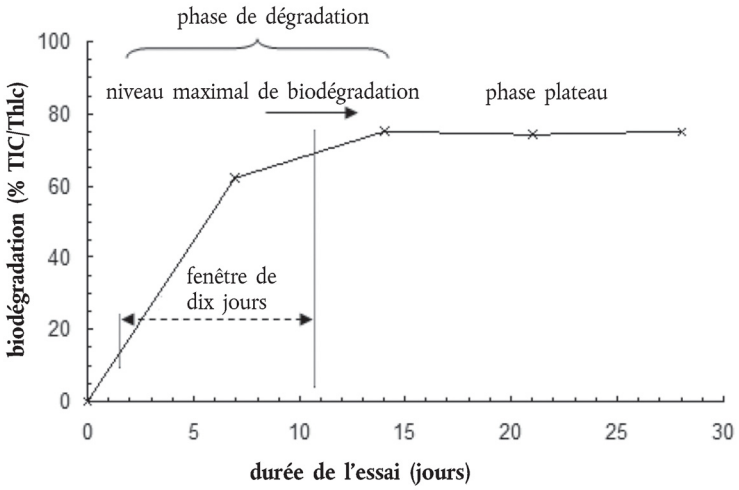
▼M4

Appendice 2

Exemple de courbe de biodégradation

Figure 1

Biodégradation du 1-octanol au cours de l'essai de l'espace de tête (dégagement de CO_2)



Glossaire

biodégradation.

phase de dégradation.

niveau maximal de biodégradation.

phase plateau.

fenêtre de dix jours.

durée de l'essai (jours).

▼M4

C. 30. BIOACCUMULATION CHEZ LES OLIGOCHÈTES TERRESTRES

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 317 (2010) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Parmi les méthodes d'essai relatives au devenir environnemental, celles intitulées «Bioconcentration: essai avec renouvellement continu sur les poissons» [chapitre C.13 de la présente annexe (49)] et «Bioaccumulation chez les oligochètes benthiques fouisseurs» (53) ont été publiées, respectivement, en 1996 et en 2008. Il est difficile voire impossible d'extrapoler aux organismes terrestres comme les vers de terre les données sur la bioaccumulation en milieu aquatique. Des calculs de modèles fondés sur la lipophilie d'une substance d'essai, voir par exemple (14) ou (37), sont actuellement utilisés pour évaluer la bioaccumulation des substances chimiques dans le sol, notamment dans le document d'orientation technique de l'Union européenne (19). La nécessité d'appliquer une méthode d'essai comportant des compartiments spécifiques a déjà été exposée (55). Une telle méthode est particulièrement importante pour évaluer l'empoisonnement secondaire dans les chaînes alimentaires terrestres (4). Plusieurs méthodes d'essai nationales portent sur la bioaccumulation chez les organismes autres que les poissons, par exemple (2) et (72). Une méthode d'évaluation de la bioaccumulation chez les vers de terre (*Eisenia fetida*, Savigny) et les enchytrées dans des sols contaminés a été élaborée par l'American Society for Testing and Materials (ASTM) (3). Une méthode internationalement reconnue visant à déterminer la bioaccumulation dans un sol chargé permettra de mieux évaluer les risques des produits chimiques pour les écosystèmes terrestres, notamment (25) et (29).

2. Les invertébrés géophages sont exposés aux substances chimiques présentes dans le sol. Au nombre de ces animaux, les oligochètes terrestres jouent un rôle important dans la structure et la fonction des sols (15) (20). Les oligochètes terrestres vivent dans le sol et, partiellement, à sa surface (notamment sur la litière); ils représentent fréquemment l'espèce la plus abondante en termes de biomasse (54). Leur rôle dans la bioturbation du sol et leur fonction de proies confèrent à ces animaux une influence considérable sur la biodisponibilité des substances chimiques pour d'autres organismes comme les prédateurs invertébrés [dont les acariens et les coléoptères; voir notamment (64)] ou vertébrés [dont les renards et les mouettes (18) (62)]. Certaines espèces d'oligochètes terrestres actuellement utilisées dans les essais écotoxicologiques sont décrites à l'appendice 5.

3. Le guide de l'ASTM sur les essais en laboratoire consacrés à la toxicité du sol ou à la bioaccumulation chez les vers de terre *Eisenia fetida* et les enchytrées *Enchytraeus albidus* (3) fournit nombre d'informations essentielles qui ont servi à mettre en œuvre la méthode d'essai exposée ici sur la bioaccumulation dans le sol. Parmi les autres références citées dans la présente méthode d'essai figurent le chapitre C.13 de la présente annexe, intitulé «Bioconcentration: essai avec renouvellement continu sur les poissons» (49) et la ligne directrice 315 de l'OCDE intitulée «Bioaccumulation chez les oligochètes benthiques fouisseurs» (53). Des expériences pratiques tirées d'études et de diverses publications sur la bioaccumulation dans le sol, dont (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79), ont également largement inspiré la présente méthode d'essai.

4. Cette méthode d'essai s'applique essentiellement aux substances chimiques organiques neutres, stables, qui ont tendance à être adsorbées dans le sol. Elle permet également d'évaluer la bioaccumulation de composés organométalliques stables, associés au sol. Cette méthode s'applique aussi aux métaux et autres éléments présents à l'état de traces.

PRÉREQUIS

5. Les essais visant à mesurer la bioaccumulation d'une substance dans les oligochètes terrestres ont été réalisés avec des métaux lourds [voir notamment (63)] et des substances organiques persistantes dont le log K_{ow} (K_{oe}) se situe entre 3,0 et 6,0 (40). Ces essais s'appliquent également aux:

   — substances dont le log K_{ow} est supérieur à 6,0 (substances super-hydrophobes),

▼M4

— substances appartenant à la classe des substances organiques connues pour leur potentiel de bioaccumulation dans les organismes vivants, par exemple les substances fortement adsorbantes ou tensio-actives,

— substances qui présentent un potentiel de bioaccumulation de par leurs caractéristiques structurelles (analogues des substances dont le potentiel de bioaccumulation est connu),

— métaux.

6. Avant de débuter toute étude, il convient de disposer de certaines informations sur la substance d'essai, comme le nom courant, le nom chimique (de préférence le nom IUPAC), la formule structurale, le numéro CAS, la pureté, les mesures de sécurité, les conditions de stockage appropriées et les méthodes d'analyse. Il faut aussi connaître les propriétés suivantes de la substance:

a) solubilité dans l'eau;

b) coefficient de partage octanol-eau, K_{ow};

c) coefficient de partage sol-eau, exprimé par K_{oc};

d) pression de vapeur;

e) dégradabilité (dans le sol ou l'eau notamment);

f) métabolites connus.

7. Il est possible d'utiliser des substances d'essai radiomarquées ou non. Cependant, l'utilisation de substances radiomarquées est recommandée car elle facilite l'analyse. La décision d'y recourir dépendra des limites de détection ou de la nécessité de mesurer le composé parent et les métabolites. Dans le cas où une substance radiomarquée est utilisée et où le total des résidus radioactifs est mesuré, il est important que les résidus radiomarqués tant dans le sol que dans les organismes d'essai soient définis en pourcentages de la substance d'essai parente et de la substance marquée non-parente, par exemple dans des échantillons prélevés à un état stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption, pour permettre de calculer le facteur de bioaccumulation (FBA) pour la substance d'essai parente et les métabolites du sol pertinents (voir paragraphe 50). Il peut s'avérer nécessaire de modifier la méthode décrite ici, en particulier en vue de disposer d'une biomasse suffisante pour mesurer les substances d'essai organiques non-radiomarquées ou les métaux. Lorsque le total des résidus radioactifs est mesuré (par comptage en scintillation liquide après extraction, combustion ou solubilisation des tissus), le facteur de bioaccumulation est basé sur la susbtance d'essai parente et sur les métabolites. Il est préférable que le FBA soit calculé sur la base de la concentration de la substance d'essai parente dans les organismes et du total des résidus radioactifs. Ensuite, le facteur d'accumulation biota-sol (BSAF) (*biota-soil accumulation factor*), normalisé par rapport à la teneur en lipides des vers et à la teneur en carbone organique (CO) du sol, est calculé à partir du FBA pour garantir la comparabilité des résultats de différents essais de bioaccumulation.

8. Il convient que la toxicité de la substance d'essai envers les espèces utilisées dans l'essai soit connue, notamment la concentration d'effet (CE_x) ou la concentration létale (CL_x) pour la durée de la phase d'absorption [(19) par exemple]. La concentration de la substance d'essai représente de préférence environ 1 % de sa CL_{50} aiguë asymptotique, et elle est au moins dix fois supérieure à sa limite de détection dans le sol par la méthode d'analyse utilisée. La préférence est donnée, lorsqu'elles sont disponibles, aux valeurs de toxicité issues d'études à long terme sur les effets sublétaux observés (51) et (52). Si ces données ne sont pas disponibles, un essai de toxicité aiguë apportera des informations utiles [voir notamment (23)].

▼M4

9. Il est nécessaire de disposer d'une méthode d'analyse appropriée, dont on connaît l'exactitude, la précision et la sensibilité pour quantifier la substance dans les solutions d'essai, dans le sol et dans le matériel biologique; il est aussi nécessaire de disposer des détails de la préparation et du stockage des échantillons, et des fiches de données de sécurité des substances. Il convient également de connaître les limites de détection analytiques de la substance d'essai dans le sol et les tissus du ver. Si une substance d'essai marquée au ^{14}C est utilisée, il est nécessaire de connaître aussi la radioactivité spécifique (c'est-à- dire en Bq.mol-1) et le pourcentage de radioactivité associé aux impuretés. La radioactivité spécifique de la substance d'essai sera suffisamment élevée pour faciliter l'analyse et les concentrations d'essai utilisées ne provoqueront pas d'effets toxiques.

10. L'essai peut être réalisé sur sol naturel ou artificiel. Avant le début de l'essai, il convient de connaître les caractéristiques du sol naturel utilisé, par exemple son origine ou ses constituants, son pH, sa teneur en carbone organique, sa distribution granulométrique (pourcentages de sable, de limon et d'argile), et sa capacité de rétention d'eau (CRE) (3) (48).

PRINCIPE DE L'ESSAI

11. Les paramètres qui caractérisent la bioaccumulation d'une substance d'essai se composent du facteur de bioaccumulation (FBA), de la constante de vitesse d'absorption (k_s) et de la constante de vitesse d'élimination (k_e). L'appendice 1 donne des définitions détaillées de ces paramètres.

12. L'essai consiste en deux phases, la phase d'absorption (exposition) et la phase d'élimination (postexposition). Durant la phase d'absorption, des groupes répliqués de vers sont exposés au sol chargé avec la substance d'essai. En plus des animaux d'essai, des groupes témoins de vers sont conservés dans des conditions identiques, sans la substance d'essai. Le poids sec et la teneur en lipides des organismes d'essai sont mesurés. Pour ce faire, on peut utiliser des vers du groupe témoin. Les valeurs de fond analytiques (essai à blanc) peuvent être obtenues en analysant des échantillons des vers et du sol témoins. Pour la phase d'élimination, les vers sont transférés dans un sol dépourvu de la substance d'essai. Une phase d'élimination est toujours nécessaire sauf si l'absorption de la substance d'essai au cours de la phase d'exposition s'avère être non significative. Elle permet de recueillir des informations sur la vitesse à laquelle la substance d'essai est excrétée par l'organisme d'essai (27). Si un état stationnaire n'a pas été atteint durant la phase d'absorption, il est préférable de déterminer les paramètres cinétiques – constantes de vitesse d'absorption et d'élimination, facteur de bioaccumulation cinétique FBAk – en s'appuyant sur l'ajustement simultané des résultats des phases d'absorption et d'élimination. La concentration de la substance d'essai dans ou sur les vers est contrôlée pendant toute la durée des deux phases de l'essai.

13. Durant la phase d'absorption, des mesures sont effectuées pendant des temps de prélèvement pouvant durer jusqu'à 14 jours (enchytrées) ou 21 jours (vers de terre) jusqu'à ce que l'état stationnaire soit atteint (11) (12) (67). On identifie un état stationnaire lorsque le tracé de la concentration dans les vers en fonction du temps est parallèle à l'axe du temps, et lorsque trois analyses successives de la concentration réalisées sur des échantillons prélevés à des intervalles d'au moins deux jours ne diffèrent pas de plus de ± 20 % l'une par rapport à l'autre sur la base de comparaisons statistiques (par exemple, analyse de la variance, analyse de la régression).

14. La phase d'élimination consiste à transférer les organismes d'essai dans des récipients qui contiennent un substrat identique, mais sans la substance d'essai. Durant la phase d'élimination, les mesures sont réalisées pendant des durées pouvant aller jusqu'à 14 jours (enchytrées) ou 21 jours (vers de terre), à moins qu'une détermination analytique antérieure n'ait mis en évidence une diminution de 90 % des résidus de substance d'essai dans les vers. La concentration de la substance d'essai dans les vers à la fin de la phase d'élimination est consignée comme résidus non éliminés. Le facteur de

▼M4

bioaccumulation à l'état stationnaire (*steady state*) (FBAss) est calculé de préférence à la fois comme le rapport de la concentration dans les vers (C_a) à celle dans le sol (C_s) à un état stationnaire apparent, et comme un facteur de bioaccumulation cinétique (FBAK), c'est-à-dire comme le rapport de la constante de vitesse d'absorption à partir du sol (k_s) à la constante de vitesse d'élimination (k_e) (voir l'appendice 1 pour les définitions) en supposant une cinétique du premier ordre (voir l'appendice 2 pour les calculs). Si la cinétique du premier ordre n'est manifestement pas applicable, il convient d'employer d'autres modèles.

15. La constante de vitesse d'absorption, la constante de vitesse d'élimination (ou les constantes, si d'autres modèles ont été utilisés), le facteur de bioaccumulation cinétique (FBAK), et lorsque cela est possible, les limites de confiance de chacun de ces paramètres, sont calculés à partir d'équations de modèles à l'aide de programmes informatiques (voir l'appendice 2). La qualité de l'ajustement d'un modèle peut être déterminée à partir du coefficient de corrélation ou du coefficient de détermination (des coefficients proches de 1 indiquent une bonne qualité d'ajustement) ou de la loi du chi-deux. De plus la grandeur de l'écart-type ou de l'intervalle de confiance autour des paramètres estimés peut donner une bonne indication de la qualité de l'ajustement du modèle.

16. Pour réduire la variabilité des résultats pour les substances de lipophilie élevée, les facteurs de bioaccumulation sont exprimés par rapport à la teneur en lipides et à la teneur en carbone organique [teneur en kg de carbone organique (CO) du sol par teneur en kg de lipides des vers]. Cette approche s'appuie sur le fait que, pour certaines classes chimiques, il existe une relation claire entre le potentiel de bioaccumulation et la lipophilie; cette relation a été clairement établie pour le poisson (47). Il existe une relation entre la teneur en lipides du poisson et la bioaccumulation de ces substances. Pour les organismes benthiques, des corrélations similaires ont été trouvées [voir notamment (30) (44)]. Cette corrélation a également été démontrée pour les oligochètes terrestres (5) (6) (7) (14). Si on dispose de suffisamment de tissu de vers, il est possible de déterminer la teneur en lipides des animaux d'essai sur le même matériel biologique que celui utilisé pour déterminer la concentration de la substance d'essai. Il est également possible de mesurer la teneur en lipides en utilisant des animaux témoins.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

17. Pour qu'un essai soit valable, les critères suivants seront remplis tant concernant les animaux témoins que les animaux traités:

— à l'issue de l'essai, la mortalité totale au cours des phases d'absorption et d'élimination ne dépasse pas 10 % (vers de terre) ou 20 % (enchytrées) du nombre total de vers introduits,

— avec *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*, la perte de poids moyenne mesurée à la fin des phases d'absorption et d'élimination ne dépasse pas 20 % du poids frais initial au début de chaque phase.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Espèces d'essai

18. Différentes espèces d'oligochètes terrestres sont recommandées pour les essais sur la bioaccumulation. Les espèces les plus couramment employées, *Eisenia fetida* ou *Eisenia andrei* (vers de terre) ou encore *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* ou *Enchytraeus luxuriosus* (enchytrées), sont décrites à l'appendice 5.

▼M4

Appareillage

19. Il convient d'éviter avec soin d'utiliser pour l'appareillage des matériaux susceptibles de dissoudre ou d'adsorber la substance d'essai ou de laisser s'échapper des substances ayant un effet délétère sur les animaux d'essai. Il est possible d'utiliser des récipients rectangulaires ou cylindriques standard, faits dans un matériau chimiquement inerte et d'une capacité adaptée, conforme au taux de charge, c'est-à- dire au nombre de vers d'essai. De l'acier inoxydable, du plastique ou du verre peut être utilisé pour tout équipement entrant en contact avec le milieu d'essai. Les récipients d'essai devront être fermés de manière appropriée, pour éviter que les vers ne s'échappent, tout en assurant un apport d'air suffisant. Du verre silanisé peut s'avérer nécessaire pour des substances de coefficient d'adsorption élevé comme les pyréthroïdes synthétiques. Dans ces cas de figure, l'équipement devra être jeté après usage (49). Il conviendra d'éviter l'évaporation des substances radiomarquées et des substances chimiques volatiles. On utilisera des pièges (par exemple des flacons de lavage des gaz) contenant un absorbant permettant de capter d'éventuels résidus susceptibles de s'évaporer des récipients d'essai.

Sol

20. Il convient que le sol d'essai soit être d'une qualité permettant la survie et de préférence la reproduction des organismes d'essai durant les périodes d'acclimatation et d'essai, sans qu'ils ne présentent un aspect ou un comportement anormal. Les vers devront pouvoir s'enfouir dans le sol.

21. Il est recommandé d'utiliser comme substrat lors des essais le sol artificiel décrit au chapitre C.8 de la présente annexe (48). La préparation du sol artificiel en vue d'essais sur la bioaccumulation est décrite à l'appendice 4, où figurent également des recommandations relatives au stockage de ce sol artificiel. Tout sol artificiel séché à l'air peut être stocké à température ambiante jusqu'à son utilisation.

22. Toutefois, il est possible d'utiliser des sols naturels provenant de sites non pollués comme sol d'essai et/ou d'élevage. Les sols naturels sont caractérisés au moins par leur origine (site de prélèvement), leur pH, leur teneur en carbone organique, leur distribution granulométrique (pourcentage de sable, de limon et d'argile), leur capacité maximale de rétention d'eau (CREmax), et leur teneur en eau (3). La recherche de micropolluants dans le sol ou dans ses constituants, préalablement à son utilisation, devrait fournir des informations utiles. En cas d'utilisation d'un sol naturel prélevé sur des terres agricoles, il convient que ce dernier n'ait pas été traité avec des produits phytopharmaceutiques ou n'ait pas fait l'objet d'un épandage de fumier d'animaux traités pendant au moins un an avant l'échantillonnage, ou d'un épandage d'engrais organiques pendant au moins six mois avant l'échantillonnage (50). Les procédures de manipulation des sols naturels avant utilisation dans le cadre d'essais écotoxicologiques sur des oligochètes en laboratoire sont décrites dans le document de l'ASTM (3). La durée de stockage des sols naturels au laboratoire est aussi courte que possible.

Application de la substance d'essai

23. La substance d'essai est incorporée dans le sol. Il convient de prendre en compte les propriétés physico-chimiques de cette substance. Une substance d'essai soluble dans l'eau est entièrement dissoute dans l'eau avant d'être mélangée au sol. La procédure de chargement recommandée pour les substances d'essai peu solubles dans l'eau consiste à enrober un ou plusieurs des constituants du sol (artificiel) avec la substance d'essai. Par exemple, le sable de quartz, ou une portion de celui-ci, peut être trempé dans une solution de la substance d'essai dans un solvant organique adapté, lequel est ensuite

▼M4

lentement évaporé jusqu'à dessiccation. La fraction enrobée peut ensuite être mélangée avec le sol mouillé. Cette procédure a pour principal avantage de n'introduire aucun solvant dans le sol. En cas d'utilisation d'un sol naturel, la substance d'essai peut être ajoutée soit par chargement d'une portion du sol séchée à l'air comme décrit précédemment pour le sol artificiel, soit par mélange avec le sol mouillé, puis évaporation si un agent de solubilisation est utilisé. En règle générale, il conviendra d'éviter autant que possible tout contact du sol mouillé avec les solvants. Les éléments suivants sont à prendre en considération (3):

— si un solvant autre que l'eau est utilisé, il convient qu'il soit miscible à l'eau et/ou puisse être éliminé (par évaporation notamment) pour ne laisser que la substance chimique d'essai sur le sol,

— si un témoin solvant est utilisé, aucun témoin négatif n'est nécessaire. Le témoin solvant présentera la plus forte concentration de solvant ajouté au sol et le solvant en question sera issu du même lot que celui utilisé pour la solution mère. La toxicité et la volatilité du solvant ainsi que la solubilité de la substance d'essai dans le solvant sélectionné constituent les principaux critères de choix pour l'agent de solubilisation.

24. Pour les substances peu solubles dans l'eau et les solvants organiques, 2,0 à 2,5 g de sable quartzique finement broyé par récipient d'essai peuvent être mélangés, au moyen d'un mortier et d'un pilon par exemple, à la quantité nécessaire de la substance d'essai pour obtenir la concentration expérimentale voulue. Ce mélange de sable quartzique et de la substance d'essai est ajouté au sol préhumidifié, auquel il est mélangé complètement après l'ajout de la quantité nécessaire d'eau désionisée pour atteindre l'humidité requise. Le mélange final est réparti entre les récipients d'essai. On répète la procédure pour chaque concentration expérimentale et on prépare un témoin approprié de 2,0 à 2,5 g de sable quartzique finement broyé par récipient d'essai.

25. La concentration de la substance d'essai dans le sol est déterminée après chargement. La répartition homogène de la substance d'essai dans le sol est contrôlée avant l'introduction des organismes d'essai. La méthode de chargement choisie et les raisons de ce choix sont notées (24).

26. Idéalement, il convient d'établir un équilibre entre le sol et l'eau interstitielle avant l'ajout des organismes; une période de quatre jours à 20 °C est recommandée. Pour un grand nombre de substances chimiques organiques faiblement solubles dans l'eau, le laps de temps nécessaire pour qu'un véritable équilibre soit atteint entre les parties adsorbées et dissoutes peut s'étendre sur plusieurs jours ou plusieurs mois. Selon l'objectif de l'étude, par exemple lorsqu'il s'agit de simuler des conditions environnementales, il peut être nécessaire de «vieillir» plus longtemps le sol chargé [trois semaines à 20 °C pour les métaux notamment (22)].

Élevage des animaux d'essai

27. Il est préférable de conserver les vers en élevage de laboratoire permanent. Des conseils sur les méthodes d'élevage en laboratoire concernant *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*, et les espèces enchytrées figurent à l'appendice 5 [voir aussi (48), (51) et (52)].

28. Il convient que les vers utilisés dans les essais ne présentent pas de maladies, anomalies ou parasites observables.

DÉROULEMENT DE L'ESSAI

29. Les organismes d'essai sont exposés à la substance d'essai durant la phase d'absorption. La phase d'absorption dure 14 jours (enchytrées) ou 21 jours (vers de terre) sauf s'il est prouvé que l'état stationnaire a été atteint.

▼M4

30. Pour la phase d'élimination, les vers sont transférés sur un sol dépourvu de la substance d'essai. Le premier échantillon est prélevé de 4 à 24 h après le début de la phase d'élimination. L'appendice 3 donne des exemples de programme d'échantillonnage pour une phase d'absorption de 21 jours et une phase d'élimination de 21 jours.

Organismes d'essai

31. Chez de nombreuses espèces d'oligochètes terrestres, le poids individuel est très faible (5 à 10 mg de poids humide par individu pour *Enchytraeus albidus* et moins pour *Enchytraeus crypticus* ou *Enchytraeus luxuriosus*); la pesée et l'analyse chimique peuvent nécessiter de réunir les vers des récipients de réplicats (tous les vers d'un récipient de réplicat sont utilisés afin d'obtenir un seul résultat pour les tissus analysés). Vingt enchytrées sont ajoutés à chaque réplicat, et au moins trois réplicats sont utilisés. Si la limite de détection analytique de la substance d'essai est élevée, il peut être nécessaire d'utiliser un plus grand nombre de vers. Pour les espèces d'essai de poids individuel supérieur (*Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*), il est possible de recourir à des récipients de réplicats contenant un seul individu.

32. Il convient que les vers de terre utilisés lors d'un essai soient de poids similaire (*Eisenia fetida* et *Eisenia andrei* ont par exemple un poids individuel de 250 à 600 mg). Les enchytrées (*Enchytraeus albidus* notamment) mesurent environ 1 cm de long. Tous les vers utilisés pour un même essai proviennent de la même source et sont adultes (avec un clitellum) (appendice 5). Le poids et l'âge d'un animal pouvant influer sur les valeurs de FBA (par exemple, du fait d'une teneur en lipides variable et/ou de la présence d'œufs), ces paramètres sont consignés avec précision, et pris en compte dans l'interprétation des résultats. De plus, des cocons sont susceptibles d'apparaître pendant la période d'exposition, ce qui a également des répercussions sur les valeurs de FBA. Il est recommandé de peser un sous-échantillon des vers avant l'essai afin d'estimer les poids humides et secs moyens.

33. Un rapport sol/vers élevé est utilisé afin de minimiser la baisse de la concentration de la substance d'essai dans le sol durant la phase d'absorption. Il est recommandé que ce rapport s'élève au minimum, pour *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*, à 50 g de poids sec de sol par ver et, pour les enchytrées, à 10-20 g de poids sec de sol par récipient d'essai. La couche de sol contenu dans les récipients a une épaisseur de 2 à 3 cm (enchytrées) ou de 4 à 5 cm (vers de terre).

34. Les vers utilisés lors d'un essai sont extraits du milieu d'élevage (les enchytrées par exemple à l'aide de pinces de joaillier). Les animaux adultes sont transférés pour acclimatation sur un sol d'essai non traité, puis nourris (voir le paragraphe 36). Si les conditions d'essai diffèrent des conditions d'élevage, une phase d'acclimatation de 24 à 72 h devrait suffire à l'adaptation des vers aux conditions d'essai. Une fois acclimatés, les vers de terre sont transférés dans des récipients en verre (des boîtes de Petri par exemple) contenant une eau propre pour y être rincés, puis ils sont pesés avant d'être déposés sur le sol d'essai. Avant la pesée, tout excès d'eau est enlevé en tapotant délicatement les vers contre le bord du récipient ou en les séchant précautionneusement à l'aide d'une serviette en papier légèrement humidifiée.

35. Le comportement d'enfouissement des organismes d'essai est observé et consigné. Dans les essais menés avec des vers de terre, les animaux (témoins et traités) s'enfouissent dans le sol normalement en quelques heures; ceci est vérifié 24 h maximum après l'ajout des vers dans le récipient d'essai. Si ce n'est pas le cas (par exemple, plus de 10 % ne s'enfouissent pas pendant

▼M4

plus
de la moitié de la phase d'absorption), soit les conditions d'essai ne sont pas appropriées, soit les organismes d'essai ne sont pas en bonne santé. Il conviendra alors d'arrêter l'essai et de le répéter. Les enchytrées vivant essentiellement dans les pores interstitiels du sol, il arrive souvent que leur tégument soit seulement partiellement en contact avec le substrat environnant. On suppose que l'exposition des enchytrées enfouis et non enfouis est équivalente, et le non-enfouissement des enchytrées n'exige pas nécessairement de répéter l'essai.

Alimentation

36. L'alimentation des organismes d'essai est envisagée si le sol utilisé présente une faible teneur en carbone organique total. Avec un sol artificiel, il est recommandé d'alimenter les vers suivant une fréquence hebdomadaire (une fois par semaine) à raison de 7 mg de fumier séché par gramme de masse sèche du sol pour les vers de terre, et de 2 à 2,5 mg de flocons d'avoine moulus par gramme de masse sèche du sol pour les enchytrées (11). La première ration est mélangée au sol immédiatement avant l'ajout des organismes d'essai. Il convient d'employer, de préférence, le même type d'alimentation que pour l'élevage (appendice 5).

Régime d'éclairage et température

37. Les essais sont menés suivant un cycle contrôlé de 16/8 heures de lumière/obscurité, avec une intensité lumineuse comprise de préférence entre 400 et 800 lx au niveau des récipients d'essai (3). La température est maintenue à 20 ± 2 °C tout au long de l'essai.

Concentrations d'essai

38. Une seule concentration est utilisée. Les cas où une ou plusieurs concentrations seraient requises font l'objet d'une justification. Si la toxicité (CE_x) de la substance d'essai est voisine de la limite de détection analytique, on recommande l'utilisation d'une substance d'essai radiomarquée, de radioactivité spécifique élevée. Pour les métaux, la concentration devra être supérieure à la concentration de fond dans les tissus et le sol.

Réplicats

39. Concernant les mesures de cinétique (phase d'absorption et d'élimination), le nombre minimum de récipients de réplicats traités devra être de trois par point d'échantillonnage. Le nombre total de réplicats préparés suffira à couvrir tous les temps de prélèvement prévus au cours des phases d'absorption et d'élimination.

40. Pour les observations et les mesures biologiques (rapport poids sec/poids humide, teneur en lipides) et pour l'analyse des concentrations de fond dans les vers et le sol, au moins 12 récipients de réplicats d'un témoin négatif (quatre échantillons prélevés au démarrage, quatre à la fin de la phase d'absorption et quatre à la fin de la phase d'élimination) sont fournis, si aucun solvant autre que l'eau n'a été utilisé. Si un agent de solubilisation est utilisé pour l'application de la substance d'essai, il convient de prévoir, en plus des réplicats traités, des témoins solvant (quatre récipients de réplicats devront faire l'objet d'un prélèvement au démarrage, quatre à la fin de la phase d'absorption et quatre à la fin de la phase d'élimination) contenant tous les constituants, à l'exception de la substance d'essai. Dans ce cas, quatre récipients supplémentaires de réplicats d'un témoin négatif (sans solvant) pourront également être fournis pour procéder à un nouvel échantillonnage à la fin de la phase d'absorption. Ces réplicats pourront être comparés biologiquement avec le témoin solvant afin d'obtenir des informations sur une éventuelle influence du solvant sur les organismes d'essai. Il est recommandé de prévoir un nombre suffisant de récipients supplémentaires de réplicats de réserve (huit, par exemple) pour les vers traités et les vers témoins.

▼M4

Fréquence des mesures de la qualité du sol

41. Le pH et le taux d'humidité du sol sont mesurés au début et à la fin des phases d'absorption et d'élimination. La température de la chambre d'essai est relevée en continu. Il convient de contrôler l'humidité du sol une fois par semaine en pesant les récipients d'essai et en comparant leur poids au moment des contrôles avec leur poids en début d'essai. Les pertes d'humidité sont compensées par l'ajout d'eau désionisée.

Échantillonnage et analyse des vers et du sol

42. L'appendice 3 donne un exemple de programme d'échantillonnage pour les phases d'absorption et d'élimination des essais de bioaccumulation sur les vers de terre et les enchytrées.

43. Un échantillon du sol est prélevé dans les récipients d'essai pour déterminer la concentration de la substance d'essai avant l'introduction des vers, puis durant les phases d'absorption et d'élimination. Pendant l'essai, les concentrations de la substance d'essai sont déterminées dans les vers et dans le sol. En règle générale, on mesure les concentrations totales dans le sol. On peut également mesurer les concentrations dans l'eau interstitielle; dans ce cas, il convient de justifier ce choix et de décrire les méthodes appropriées prévues avant le début de l'étude, puis de consigner ces informations dans le rapport.

44. Les vers et le sol sont échantillonnés au moins à six reprises durant les phases d'absorption et d'élimination. Si la stabilité d'une substance d'essai est démontrée, le nombre d'analyses du sol peut être réduit. Il est recommandé d'analyser au moins trois réplicats au début et à la fin de la phase d'absorption. Si la concentration mesurée dans le sol à la fin de la phase d'absorption s'écarte de la concentration initiale de plus de 30 %, les échantillons de sol prélevés à d'autres dates sont également analysés.

45. Enlever du sol les vers d'un réplicat donné à chaque temps de prélèvement (par exemple, après avoir étalé le sol du réplicat sur un plateau peu profond et prélevé les vers à l'aide d'une pince de joaillier), les rincer rapidement à l'eau dans un récipient peu profond en verre ou en acier. Enlever l'eau en excès (voir le paragraphe 34). Transférer délicatement les vers dans un récipient préalablement taré, et les peser immédiatement, en incluant le contenu de l'intestin.

46. Les vers de terre (*Eisenia* sp.) doivent pouvoir purger leur intestin pendant la nuit, par exemple sur un papier filtre humide dans une boîte de Petri fermée (voir paragraphe 34). Après la purge, il convient de déterminer le poids des vers afin d'évaluer la perte éventuelle de biomasse pendant l'essai (voir les critères de validité au paragraphe 17). La pesée et l'analyse des tissus des enchytrées sont effectuées sans purge, ceci étant techniquement difficile en raison de la petite taille de ces vers. Une fois le poids final déterminé, les vers sont tués immédiatement, en utilisant la méthode la plus appropriée (par exemple avec de l'azote liquide, ou en congelant les vers à une température inférieure à - 18 °C).

47. Durant la phase d'élimination, les vers remplacent le contenu contaminé de leur intestin par des éléments du sol propre. Autrement dit, les mesures réalisées sur un échantillon de vers qui ne se sont pas purgés (les enchytrées en l'occurrence) immédiatement avant la phase d'élimination incluent le sol contaminé présent dans l'intestin. S'agissant des oligochètes aquatiques, on suppose qu'après les 4 à 24 h initiales de la phase d'élimination, l'essentiel du contenu intestinal contaminé a été remplacé par du sédiment propre [voir notamment (46)]. Des observations similaires ont été rapportées pour les vers de terre lors d'études sur l'accumulation de cadmium et de zinc radiomarqués (78). Chez les enchytrées ne s'étant pas purgés, la concentration de ce premier échantillon de la phase d'élimination peut être considérée comme la concentration dans les tissus après la purge de l'intestin. Pour tenir compte de la dilution de la concentration de la substance d'essai par du sol non contaminé durant la phase d'élimination, il est possible d'estimer le poids du contenu de l'intestin à partir des rapports poids des vers humides/poids des cendres de vers ou poids des vers secs/poids des cendres de vers.

▼M4

48. Il est préférable d'analyser les échantillons de sol et de vers immédiatement après extraction (c'est-à-dire dans les 1 à 2 jours suivants) afin d'éviter des dégradations ou d'autres pertes, et il est recommandé de calculer les vitesses approximatives d'absorption et d'élimination pendant le déroulement de l'essai. Si l'analyse est retardée, les échantillons devront être stockés suivant une méthode appropriée, par exemple, en procédant à leur congélation (≤ -18 °C).

49. Il conviendra de vérifier que la précision et la reproductibilité de l'analyse chimique, ainsi que la récupération de la substance d'essai dans les échantillons de sol et de vers sont satisfaisantes pour la méthode donnée; l'efficacité d'extraction, la limite de détection et la limite de quantification devront être consignées. De même, il faudra s'assurer que la substance d'essai n'est pas détectable dans les récipients témoins à des concentrations supérieures à la concentration de fond. Si la concentration de la substance d'essai dans l'organisme d'essai C_a est > 0 pour les vers témoins, il faudra l'inclure au calcul des paramètres cinétiques (appendice 2). Pendant toute la durée de l'essai, tous les échantillons sont manipulés de façon à réduire au minimum les contaminations et les pertes (résultant, par exemple, de l'adsorption de la substance d'essai sur le dispositif d'échantillonnage).

50. En cas d'utilisation de substances d'essai radiomarquées, il est possible d'analyser le produit parent et les métabolites. Une quantification de la substance d'essai parente et des métabolites à l'état stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption fournit des informations importantes. Les échantillons sont alors nettoyés de façon à pouvoir quantifier séparément la substance d'essai parente. Si des métabolites simples excèdent 10 % de la radioactivité totale du ou des échantillons analysés, l'identification de ces métabolites est recommandée.

51. La récupération globale et la récupération de la substance d'essai dans les vers, le sol, et le cas échéant, dans les pièges contenant des absorbants permettant de retenir la substance d'essai évaporée, sont consignées et rapportées.

52. Le regroupement d'individus échantillonnés à partir d'un récipient d'essai donné est acceptable pour les enchytrées, plus petits que les vers de terre. Si ce regroupement implique de réduire le nombre de réplicats, cela restreint les procédures statistiques pouvant s'appliquer aux données. Si une procédure et une puissance statistiques spécifiques sont requises, alors l'essai comprend un nombre adéquat de récipients de réplicats, adapté aux quantités, à la procédure et à la puissance voulues.

53. Il est recommandé d'exprimer le FBA à la fois comme une fonction du poids sec total et, si nécessaire (à savoir pour des substances fortement hydrophobes), comme une fonction de la teneur en lipides. La teneur en lipides est déterminée par des méthodes appropriées [certaines méthodes existantes, voir par exemple (31) ou (58), ont besoin d'être adaptées à cette fin]. Ces méthodes s'appuient sur une technique d'extraction au chloroforme/méthanol. Toutefois, afin d'éviter l'utilisation de solvants chlorés, il convient d'utiliser une version modifiée de la méthode de Bligh et Dyer (9) qui est décrite dans (17). Comme les diverses méthodes ne conduisent pas forcément à des valeurs identiques, il est important de détailler la méthode employée. Lorsque cela est possible, c'est-à-dire si on dispose de suffisamment de tissu de vers, la teneur en lipides est, idéalement, analysée à partir du même échantillon ou extrait que la substance d'essai, l'extrait devant souvent être débarrassé de ses lipides avant d'être analysé par chromatographie (49). Une autre possibilité consiste à mesurer la teneur en lipides sur des animaux témoins et à utiliser la valeur obtenue pour normaliser les valeurs de FBA. Cette dernière approche réduit la contamination de l'équipement par la substance d'essai.

▼M4

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

54. On obtient la courbe d'absorption de la substance d'essai en portant la concentration de la substance d'essai dans/sur les vers durant la phase d'absorption en fonction du temps, en échelle arithmétique. Lorsque la courbe atteint un plateau ou état stationnaire (voir les définitions à l'appendice 1), le facteur de bioaccumulation à l'état stationnaire (FBAss) est calculé à l'aide de la formule suivante:

$$\frac{C_a \text{ à l'état stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption (moyenne)}}{C_s \text{ à l'état stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption (moyenne)}}$$

C_a représente la concentration de la substance d'essai dans l'organisme d'essai, et

C_s la concentration de la substance d'essai dans le sol.

55. Si la courbe n'atteint pas de plateau, le FBA_K, fondé sur les constantes de vitesse, devra être déterminé à la place du BAFss comme suit:

— déterminer le facteur d'accumulation (FBA_K) comme le rapport k_s/k_e,

— les vitesses d'absorption et d'élimination sont calculées de préférence simultanément (voir l'équation 11 à l'appendice 2),

— La constante de vitesse d'élimination (k_e) est généralement déterminée à partir de la courbe d'élimination (c'est-à-dire du tracé de la concentration de la substance d'essai dans les vers durant la phase d'élimination). La constante de vitesse d'absorption k_s est ensuite calculée en fonction de k_e et d'une valeur de C_a qui est dérivée de la courbe d'absorption – voir la description de ces méthodes à l'appendice 2. La méthode préférée pour l'obtention du FBAK et des constantes de vitesse, k_s et k_e, consiste à utiliser des méthodes informatisées non linéaires d'estimation des paramètres. Si la courbe d'élimination n'obéit manifestement pas à une cinétique du premier ordre, des modèles plus complexes devront alors être utilisés.

Rapport d'essai

56. Le rapport d'essai comporte les informations suivantes:

Substance d'essai:

— toute information disponible sur la toxicité aiguë ou à long terme (par exemple CE_x, CL_x, CSEO) de la substance d'essai vis-à-vis des oligochètes fouisseurs,

— pureté, état physique et propriétés physico-chimiques, par exemple log K_{ow}, solubilité dans l'eau,

— données d'identification de la substance; provenance de la substance d'essai, identité et concentration des solvants éventuellement utilisés,

— en cas d'utilisation d'une substance d'essai radiomarquée, position précise des atomes marqués, radioactivité spécifique et pureté radiochimique.

Espèces d'essai:

— nom scientifique, souche, source, traitement préalable éventuel, acclimatation, âge, taille, etc.

▼M4

Conditions d'essai:

— procédure d'essai utilisée,

— type et caractéristiques de l'éclairage utilisé et photopériode(s),

— protocole d'essai (par exemple, nombre et dimension des récipients d'essai, masse du sol et épaisseur de la couche de sol, nombre de réplicats, nombre de vers par réplicat, nombre de concentrations d'essai, durée des phases d'absorption et d'élimination, fréquence d'échantillonnage),

— justification du matériau choisi pour les récipients d'essai,

— méthode de préparation et d'application de la substance d'essai, ainsi que raisons du choix de la méthode,

— concentrations d'essai nominales, moyennes et écarts-types des valeurs mesurées dans les récipients d'essai, et méthode d'obtention de ces valeurs,

— source des constituants du sol artificiel ou – si un milieu naturel est utilisé – origine du sol, description d'un éventuel traitement préalable, résultats des contrôles (survie, augmentation de la biomasse, reproduction), caractéristiques du sol [pH, teneur totale en carbone organique, distribution granulométrique (pourcentage de sable, de limon et d'argile), capacité maximale de rétention d'eau (CRE_{max}), teneur en eau au début et à la fin de l'essai, et toutes autres mesures réalisées],

— informations détaillées sur le traitement des échantillons de sol et de vers, y compris les détails concernant la préparation, le stockage, les procédures de chargement en substance d'essai, l'extraction et les procédures analytiques (et leur précision) pour la substance d'essai dans les vers et le sol, la teneur en lipides (si mesurée), et les méthodes de récupération de la substance d'essai.

Résultats:

— mortalité des vers témoins et des vers dans chaque récipient d'essai et éventuel comportement anormal observé (par exemple, évitement du sol, absence de reproduction lors d'un essai de bioaccumulation chez les enchytrées),

— rapport poids sec/poids humide du sol et des organismes d'essai (utiles pour la normalisation),

— poids humides des vers à chaque temps de prélèvement; pour les vers de terre, poids humides au début de l'essai, et à chaque temps de prélèvement avant et après la purge de l'intestin,

— teneur en lipides des organismes d'essai (si déterminée),

— courbes montrant les constantes cinétiques d'absorption et d'élimination de la substance d'essai chez les vers, et la durée pour atteindre l'état stationnaire,

— C_a et C_s (avec écart-type et fourchette, si nécessaire) pour tous les temps de prélèvement (C_a exprimé en $g.kg^{-1}$ de poids humide et sec du corps entier, C_s exprimé en $g.kg^{-1}$ du poids humide et sec). Si un facteur d'accumulation biote-sol (BSAF) est nécessaire (par exemple, pour une comparaison des résultats entre deux essais ou plus réalisés avec des animaux de teneurs en lipides différentes), C_a est en plus être exprimé en $g.kg^{-1}$ de teneur en lipides de l'organisme et C_s est exprimé en $g.kg^{-1}$ de carbone organique (CO) du sol,

— FBA (exprimé en kg de sol kg^{-1} de ver), constante de vitesse d'absorption du sol k_s (exprimée en g de sol kg^{-1} de vers j^{-1}), et constante de vitesse d'élimination k_e (exprimée en j^{-1}); éventuellement, BSAF (exprimé en kg de CO du sol kg^{-1} de teneur en lipides des vers),

▼M4

— le cas échéant: pourcentages de substance parente, de métabolites et de résidus liés (c'est-à-dire le pourcentage de substance d'essai ne pouvant être extraite par les méthodes d'extraction courantes) détectés dans le sol et les animaux d'essai,

— méthodes utilisées pour les analyses statistiques des données.

Évaluation des résultats:

— conformité des résultats avec les critères de validité tels qu'énoncés au paragraphe 17,

— résultats inattendus ou inhabituels, par exemple élimination incomplète de la substance d'essai des animaux d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) Amorim M. (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Master thesis, University Coimbra.

(2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.

(3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus.* ASTM International, E1676-04: 26 pp.

(4) Beek B., Boehling S., Bruckmann U., Franke C., Joehncke U., Studinger G. (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(5) Belfroid A., Sikkenk M., Seinen W., Van Gestel C., Hermens J. (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93-99.

(6) Belfroid A., Van Wezel A., Sikkenk M., Van Gestel C., Seinen W. & Hermens J. (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154-165.

(7) Belfroid A., Meiling J., Drenth H., Hermens J., Seinen W., Van Gestel C. (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185-191.

(8) Bell A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus.* Ann. Mus. Novitat. 1902: 1-13.

(9) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.

(10) Bouché M. (1972). Lombriciens de France. Écologie et systématique. INRA, Annales de zoologie-écologie animale, Paris, 671 p.

(11) Bruns E., Egeler Ph., Moser T., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

(12) Bruns E., Egeler Ph., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185-196.

(13) Conder J.M. and Lanno R.P. (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida.* J. Soils Sediments 3: 13-20.

▼M4

(14) Connell D.W. and Markwell R.D. (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91-100.

(15) Didden W.A.M. (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2-29.

(16) Didden W. (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, p. 555-576.

(17) De Boer J., Smedes F., Wells D., Allan A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(18) Dietrich D.R., Schmid P., Zweifel U., Schlatter C., Jenni-Eiermann S., Bachmann H., Bühler U., Zbinden N. (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140-145.

(19) Règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) n° 793/93 du Conseil et le règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission (JO L 396 du 30.12.2006, p. 1).

(20) Edwards C.A. and Bohlen P.J. (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.

(21) OCDE (2008). Bioaccumulation chez les oligochètes benthiques fouisseurs, ligne directrice 315 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.

(22) Egeler Ph., Gilberg D., Scheffczyk A., Moser Th. and Römbke J. (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No: 204 67 458: 149 pp. Le document peut être téléchargé à l'adresse suivante: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

(23) Elmegaard N. and Jagers op Akkerhuis G.A.J.M. (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.

(24) Environnement Canada (1995). Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité sur sédiments de contrôle dopé avec un produit toxique de référence, Série de la protection de l'environnement, Rapport SPE 1/RM/30.

(25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.

(26) Franke C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897-1905.

(27) Franke C., Studinger G., Berger G., Böhling S., Bruckmann U., Cohors-Fresenborg D., Jöhncke U. (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501-1514.

(28) Füll C. (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.

▼M4

(29) Füll C., Schulte C., Kula C. (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF - Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78-84.

(30) Gabric A.J., Connell D.W., Bell P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225-1231.

(31) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A., Parrish C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099-1105.

(32) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(33) Hund-Rinke K. and Wiechering H. (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15-20.

(34) Hund-Rinke K., Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds), Spektrum Verl., Heidelberg, 59-81.

(35) ISO 11268-2 (1998), Qualité du sol – Effets des polluants vis- à-vis des vers de terre *(Eisenia fetida),* Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction.

(36) Jaenike J. (1982). «*Eisenia foetida*» is two biological species. Megadrilogica 4: 6-8.

(37) Jager T. (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080-2090.

(38) Jager T., Sanchez P.A., Muijs B., van der Welde E., Posthuma L. (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953-961.

(39) Jager T., Baerselman R., Dijkman E., De Groot A.C., Hogendoorn E.A., DeJong A., Kruitbosch J.A.W., Peijnenburg W.J.G.M. (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767-775.

(40) Jager T., Fleuren R.L.J., Hoogendoorn E., de Korte G. (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399-3404.

(41) Janssen M.P.M., Bruins A., De Vries T.H., Van Straalen N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

(42) Kasprzak K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217-232.

(43) Khalil A.M. (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.

(44) Landrum P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi.* Environ. Sci. Toxicol. 23: 588-595.

(45) Marinussen M.P.J.C., Van der Zee S.E.A.T.M., De Haan F.A. (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17-26.

(46) Mount D.R., Dawson T.D., Burkhard L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates.* Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244-1249.

▼**M4**

(47) Nendza M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

(48) Chapitre C.8 de la présente annexe, Toxicité pour les vers de terre.

(49) Chapitre C.13 de la présente annexe, Bioconcentration: essai avec renouvellement continu sur les poissons.

(50) Chapitre C.21 de la présente annexe, Microorganismes du sol: essai de transformation de l'azote.

(51) OCDE (2004ba) Essai de reproduction chez l'enchytrée. Ligne directrice 220 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques; OCDE, Paris.

(52) OCDE (2004b) Essai de reproduction chez le lombric (Eisenia fetida/Eisenia andrei). Ligne directrice 222 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques; OCDE, Paris.

(53) OCDE (2008) Bioaccumulation chez les oligochètes benthiques fouisseurs. Ligne directrice 315 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques; OCDE, Paris.

(54) Petersen H. and Luxton M. (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388.

(55) Phillips D.J.H. (1993). Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.

(56) Pflugmacher J. (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77-81.

(57) Posthuma L., Weltje L., Anton-Sanchez F.A. (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida*. RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

(58) Randall R.C., Lee II H., Ozretich R.J., Lake J.L., Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10: 1431-1436.

(59) Römbke J., Egele P., Füll C. (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

(60) Römbke J. and Moser Th. (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/1999: 373 pp.

(61) Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.

(62) Romijn C.A.F.M., Luttik R., Van De Meent D., Slooff W.,Canton J.H. (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107-127.

(63) Sample B.E., Suter D.W., Beauchamp J.J., Efroymson R.A. (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110-2120.

(64) Schlosser H.-J. and Riepert F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413-433.

(65) Schmelz R. and Collado R. (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. novembre, a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93–100.

▼M4

(66) Sims R.W. and Gerard B.M. (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

(67) Sousa J.P., Loureiro S., Pieper S., Frost M., Kratz W., Nogueira A.J.A., Soares A.M.V.M. (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557–2563.

(68) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

(69) Stephenson G.L., Kaushik A., Kaushik N.K., Solomon K.R., Steele T., Scroggins R.P. (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds). Setac Press, Pensacola, 67-81.

(70) Sterenborg I., Vork N.A., Verkade S.K., Van Gestel C.A.M., Van Straalen N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta.* Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

(71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation – Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

(72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(73) Van Brummelen T.C. and Van Straalen N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

(74) Van Gestel C.A.M. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H., Edwards, P.J., Greig-Smith, P.W. & Heimbach, F.). Intercept Press, Andover (GB).

(75) Van Gestel C.A. and Ma W.-C. (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023-1033.

(76) Van Straalen N.M., Donker M.H., Vijver M.G., van Gestel C.A.M. (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409-417.

(77) Venter J.M. and Reinecke A.J. (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161-165.

(78) Vijver M.G., Vink J.P.M., Jager T., Wolterbeek H.T., van Straalen N.M., van Gestel C.A.M. (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843-1851.

(79) Widianarko B. and Van Straalen N.M. (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402–406.

▼M4

Appendice 1

DÉFINITIONS

La bioaccumulation est l'augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme, par rapport à la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant. La bioaccumulation est le résultat combiné des processus de bioconcentration et de bioamplification (voir ci-dessous).

La bioconcentration est l'augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme, résultant de l'absorption de la substance exclusivement depuis le milieu environnant (à savoir via la surface du corps et le sol ingéré), par rapport à la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant.

La bioamplification est l'augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme, résultant principalement de l'absorption d'aliments ou de proies contaminés, par rapport à la concentration de la substance d'essai dans l'alimentation ou la proie. La bioamplification peut conduire à un transfert ou à une accumulation de la substance d'essai dans les réseaux trophiques.

L'élimination d'une substance est la perte de cette substance par les tissus de l'organisme d'essai selon des processus actifs ou passifs survenant indépendamment de la présence ou de l'absence de la substance d'essai dans le milieu environnant.

Le facteur de bioaccumulation (FBA) à n'importe quel instant de la phase d'absorption de l'essai de bioaccumulation, est la concentration de la substance d'essai dans ou sur l'organisme d'essai (C_a en $g.kg^{-1}$ de poids humide ou sec de ver) divisée par la concentration de la substance dans le milieu environnant (C_s en $g.kg^{-1}$ de poids de sol humide ou sec). Le FBA est exprimé en kg de sol kg^{-1} de ver.

Le facteur de bioaccumulation à l'état stationnaire (FBAss), qui est le FBA à l'état stationnaire, ne varie pas de façon significative pendant une longue période, la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant (C_s en g kg^{-1} de poids de sol sec) étant constante pendant cette période.

Les facteurs de bioaccumulation calculés directement à partir du rapport de la constante de vitesse d'absorption du sol divisée par la constante de vitesse d'élimination (k_s et k_e, voir ci-dessous), sont appelés facteurs de bioaccumulation cinétiques (FBA_K).

Le facteur d'accumulation biote-sol (BSAF) est la concentration de la substance d'essai normalisée par rapport aux lipides dans/sur l'organisme d'essai, divisée par la concentration de la substance d'essai normalisée par rapport au carbone organique, dans le sol à l'état stationnaire. C_a est alors exprimée en $g.kg^{-1}$ de teneur en lipides de l'organisme, et C_s en $g.kg^{-1}$ de teneur en carbone organique du sol; le BSAF est exprimé en kg de $CO.kg^{-1}$ de lipides.

Un plateau ou état stationnaire est défini comme l'équilibre entre les processus d'absorption et d'élimination survenant simultanément durant la phase d'exposition. L'état stationnaire est atteint, dans le tracé du FBA en fonction du temps, lorsque la courbe devient parallèle à l'axe des temps et que trois analyses successives de FBA réalisées sur des échantillons pris à intervalles d'au moins deux jours ne diffèrent pas de plus de 20 % les uns des autres et qu'il n'y a pas de différence statistique significative entre les trois périodes d'échantillonnage. Pour les substances d'essai absorbées lentement, des intervalles plus appropriés seraient de sept jours (49).

Le coefficient de partage carbone organique-eau (K_{co}) est le rapport de la concentration d'une substance dans/sur la fraction de carbone organique d'un sol et de la concentration de substance dans l'eau à l'équilibre.

Le coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}) est le rapport des solubilités de la substance dans le n-octanol et dans l'eau à l'équilibre; il est parfois exprimé par P_{ow}. Le logarithme de K_{ow} ($\log K_{ow}$) est utilisé comme indicateur du potentiel de bioaccumulation de la substance par les organismes aquatiques.

▼**M4**

La phase d'absorption ou d'exposition est la durée pendant laquelle les organismes d'essai sont exposés à la substance d'essai.

La constante de vitesse d'absorption du sol (k_s) est la valeur numérique définissant la vitesse d'augmentation de la concentration de la substance d'essai dans/sur l'organisme d'essai résultant de l'absorption de la phase du sol. k_s est exprimé en g de sol kg^{-1} de ver j^{-1}.

La phase d'élimination est la durée, suite au transfert des organismes d'essai depuis un milieu contaminé dans un milieu dépourvu de la substance d'essai, durant laquelle est étudiée l'élimination (ou la perte nette) de la substance par les organismes d'essai.

La constante de vitesse d'élimination (k_e) est la valeur numérique définissant la vitesse de réduction de la concentration de la substance d'essai dans/sur l'organisme d'essai, suite au transfert des organismes d'essai depuis un milieu contenant l'élément d'essai vers un milieu dépourvu de cette substance. k_e est exprimé en j^{-1}.

Une substance d'essai est toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼M4

Appendice 2

Calcul des paramètres d'absorption et d'élimination

Le principal effet observé d'un essai de bioaccumulation est le facteur de bioaccumulation, FBA. Il est possible de calculer le FBA en divisant la concentration dans l'organisme d'essai, C_a, par la concentration dans le sol, C_s, à l'état stationnaire. Si l'état stationnaire n'est pas atteint durant la phase d'absorption, le FBA_K est calculé à partir des constantes de vitesse et non du FBAss. Il convient d'indiquer si le FBA est basé, ou non, sur des concentrations à l'état stationnaire.

La procédure habituelle pour obtenir le facteur de bioaccumulation cinétique (FBA_K), la constante de vitesse d'absorption du sol (k_s) et la constante de vitesse d'élimination (k_e) consiste à faire à appel à des méthodes informatisées non linéaires d'estimation des paramètres, par exemple à partir des modèles décrits dans (68). D'après un ensemble de valeurs séquentielles de la concentration en fonction du temps et les équations de modèles:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[équation 1]}$$

ou

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[équation 2]}$$

où:

C_a = concentration de la substance dans les vers [$g.kg^{-1}$ de poids humide ou sec]

k_s = constante de vitesse d'absorption dans les tissus [g de sol kg^{-1} de ver j - 1]

C_s = concentration de la substance dans le sol [$g.kg^{-1}$ de poids humide ou sec]

k_e = constante de vitesse d'élimination [j - 1]

t_c = temps à la fin de la phase d'absorption,

ces programmes informatiques calculent les valeurs de FBA_K, k_s et k_e.

Lorsque la concentration de fond dans les vers non exposés, par exemple au jour 0, diffère sensiblement de zéro (cela peut être le cas pour les métaux notamment), cette concentration ($C_{a,0}$) est incluse dans ces équations comme suit:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[équation 3]}$$

et

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[équation 4]}$$

Dans les cas où l'on observe une forte baisse de la concentration de la substance d'essai dans le sol durant la phase d'absorption, il est possible de recourir aux modèles suivants (par exemple, (67) et (79):

$$C_s = C_0(e^{-k}0^{t}) \qquad \text{[équation 5]}$$

▼M4

où:

C_s = concentration de la substance dans le sol [$g.kg^{-1}$ de poids humide ou sec]

k_0 = constante de vitesse de dégradation dans le sol [d^{-1}]

C_0 = concentration initiale de la substance dans le sol [$g.kg^{-1}$ de poids humide ou sec]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[équation 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[équation 7]}$$

où:

C_a = concentration de la substance dans les vers [$g.kg^{-1}$ de poids humide ou sec]

k_s = constante de vitesse d'absorption dans les tissus [g de sol kg^{-1} de vers j^{-1}]

k_0 = constante de vitesse de dégradation dans le sol [j - 1]

k_e = constante de vitesse d'élimination [j - 1]

t_c = temps à la fin de la phase d'absorption.

Lorsqu'on a atteint un état stationnaire durant la phase d'absorption (c'est-à-dire t = ∞), il est possible de réduire l'équation 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[équation 1]}$$

à:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

ou à

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[équation 8]}$$

Ensuite $k_s/k_e \times C_s$ donne une valeur approchée de la concentration de la substance d'essai dans le tissu du ver à l'état stationnaire ($C_{a,ss}$).

Le facteur d'accumulation biote-sol (BSAF) peut se calculer comme suit:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[équation 9]}$$

où f_{oc} est la fraction de carbone organique dans le sol, et f_{lip} est la fraction de lipides dans le ver, toutes deux étant déterminées, de préférence, sur des échantillons prélevés de l'essai, et basées respectivement soit sur le poids sec, soit sur le poids humide.

Il est possible de modéliser les constantes cinétiques d'élimination en utilisant les données issues de la phase d'élimination et en appliquant l'équation de modèle suivante et une méthode informatisée non linéaire d'estimation des paramètres. Si le tracé des données en fonction du temps indique une décroissance exponentielle constante de la concentration de la substance d'essai dans les animaux, le déroulement temporel de l'élimination peut être décrit par un modèle à un compartiment (équation 9).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[équation 10]}$$

▼M4

Les processus d'élimination semblent parfois se dérouler en deux étapes, montrant une décroissance rapide de C_a au cours des premières étapes, qui évolue vers une perte plus lente des éléments d'essai dans les étapes ultérieures de l'élimination [par exemple (27), (68)]. Les deux étapes peuvent être interprétées en faisant l'hypothèse de l'existence de deux compartiments dans l'organisme, compartiments à partir desquels la substance d'essai est éliminée à différentes vitesses. Dans ces cas particuliers, il convient d'étudier la littérature pertinente, par exemple (38), (39), (40), (78).

À l'aide des équations de modèles ci-dessus, on peut également calculer les paramètres cinétiques (k_s et k_e) en une seule fois, en appliquant un modèle de cinétique du premier ordre à toutes les données des phases d'absorption et d'élimination simultanément. Pour une description d'une méthode pouvant permettre un tel calcul combiné des constantes de vitesse d'absorption et d'élimination, consulter (41), (73) et (70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \quad \text{[équation 11]}$$

Note: quand les paramètres d'absorption et d'élimination sont estimés simultanément à partir des données combinées d'absorption et d'élimination, «m» tel que mentionné dans l'équation 11 est un descripteur qui permet au programme informatique d'attribuer les sous-termes de l'équation aux ensembles de données de la phase correspondante et de faire une évaluation correcte (m = 1 pour la phase d'absorption; m = 2 pour la phase d'élimination).

Quoi qu'il en soit, ces équations de modèles seront utilisées avec précaution, en particulier lorsque des modifications de la biodisponibilité de la substance d'essai, ou (bio)dégradation, surviennent durant l'essai [voir notamment (79)].

▼M4

Appendice 3

EXEMPLES DE PROGRAMMES D'ÉCHANTILLONNAGE POUR DES ESSAIS DE BIOACCUMULATION DANS LE SOL

Essai sur des vers de terre

a) Phase d'absorption avec 8 dates d'échantillonnage pour le calcul des paramètres cinétiques

Jour	Activité
- 6	Conditionnement du sol préparé durant 48 h.
- 4	Chargement d'une fraction du sol avec la solution de la substance d'essai; évaporation de tout solvant; mélange des constituants du sol; répartition du sol dans les récipients d'essai; équilibration dans les conditions d'essai durant 4 jours (3 semaines pour les sols chargés en métaux).
- 3 à - 1	Séparation des organismes d'essai du milieu d'élevage pour acclimatation; préparation et humidification des constituants du sol.
0	Mesure de la température et du pH du sol; retrait d'échantillons de sol des récipients traités et des témoins au solvant pour la détermination de la concentration de la substance d'essai; ajout d'une ration alimentaire; pesée et distribution aléatoire des vers dans les récipients d'essai; conservation d'un nombre suffisant de sous-échantillons de vers pour la détermination des valeurs de fond analytiques, des poids humide et sec, ainsi que de la teneur en lipides; pesée de tous les récipients d'essai pour le contrôle de l'humidité du sol; contrôle de l'alimentation en air, en cas de système en circuit fermé.
1	Contrôle de l'alimentation en air, consignation du comportement des vers et de la température; prélèvement d'échantillons de sol et de vers pour la détermination de la concentration de la substance d'essai.
2	Comme le 1er jour.
3	Contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers et de la température.
4	Comme le 1er jour.
5 – 6	Comme le 3^{e} jour.
7	Comme le 1er jour; ajout d'une ration alimentaire; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée.
8 – 9	Comme le 3^{e} jour.
10	Comme le 1er jour.
11 – 13	Comme le 3^{e} jour.
14	Comme le 1er jour; ajout d'une ration alimentaire; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée.
15 – 16	Comme le 3^{e} jour.
17	Comme le 1er jour.
18 – 20	Comme le 3^{e} jour.

▼**M4**

Jour	Activité
21	Comme le 1er jour; mesure de la température et du pH du sol; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai; fin de la phase d'absorption; transfert des vers des réplicats exposés restants vers des récipients contenant du sol propre pour la phase d'élimination (sans purge de l'intestin); échantillonnage du sol et des vers des témoins au solvant.
	Les activités préalables à l'exposition (phase d'équilibration) sont programmées en tenant compte des propriétés de la substance d'essai.
	Les activités décrites pour le 3e jour sont réalisées quotidiennement (au moins les jours ouvrés).

b) Phase d'élimination

Jour	Activité
- 6	Préparation et humidification des constituants du sol; conditionnement du sol préparé durant 48 h.
- 4	Mélange des constituants du sol; répartition du sol dans les récipients d'essai; incubation dans les conditions d'essai durant 4 jours.
0 (fin de la phase d'absorption)	Mesure de la température et du pH du sol; pesée et distribution aléatoire des vers dans les récipients d'essai; ajout d'une ration alimentaire; transfert des vers des réplicats exposés restants vers des récipients contenant du sol propre; prélèvement d'échantillons de sol et de vers après 4 à 6 h pour la détermination de la concentration de la substance d'essai.
1	Contrôle de l'alimentation en air, consignation du comportement des vers et de la température; prélèvement d'échantillons de sol et de vers pour la détermination de la concentration de la substance d'essai.
2	Comme le 1er jour.
3	Contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers et de la température.
4	Comme le 1er jour.
5 – 6	Comme le 3e jour.
7	Comme le 1er jour; ajout d'une ration alimentaire; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée.
8 – 9	Comme le 3e jour.
10	Comme le 1er jour.
11 – 13	Comme le 3e jour.
14	Comme le 1er jour; ajout d'une ration alimentaire; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée.
15 – 16	Comme le 3e jour.
17	Comme le 1er jour.

▼M4

Jour	Activité
18 – 20	Comme le 3e jour.
21	Comme le 1er jour; mesure de la température et du pH du sol; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai; échantillonnage du sol et des vers des témoins au solvant.
	La préparation du sol avant le début de la phase d'élimination intervient de la même manière qu'avant la phase d'absorption.
	Les activités décrites pour le 3e jour sont réalisées quotidiennement (au moins les jours ouvrés).

Essai sur des enchytrées

a) Phase d'absorption avec 8 dates d'échantillonnage pour le calcul des paramètres cinétiques

Jour	Activité
- 6	Conditionnement du sol préparé durant 48 h.
- 4	Chargement d'une fraction du sol avec la solution de la substance d'essai; évaporation de tout solvant; mélange des constituants du sol; répartition du sol dans les récipients d'essai; équilibration dans les conditions d'essai durant 4 jours (3 semaines pour les sols chargés en métaux).
- 3 à - 1	Séparation des organismes d'essai du milieu d'élevage pour acclimatation; préparation et humidification des constituants du sol.
0	Mesure de la température et du pH du sol; retrait d'échantillons de sol des récipients traités et des témoins au solvant pour la détermination de la concentration de la substance d'essai; ajout d'une ration alimentaire dans le sol; pesée et distribution aléatoire des vers dans les récipients d'essai; conservation de suffisamment de sous-échantillons de vers pour la détermination des valeurs de fond analytiques, du poids sec et humide et de la teneur en lipides; pesée de tous les récipients d'essai pour le contrôle de l'humidité du sol; contrôle de l'alimentation en air, en cas de système en circuit fermé.
1	Contrôle de l'alimentation en air, consignation du comportement des vers et de la température; prélèvement d'échantillons de sol et de vers pour la détermination de la concentration de la substance d'essai.
2	Comme le 1er jour.
3	Contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers et de la température.
4	Comme le 1er jour.
5 – 6	Comme le 3e jour.
7	Comme le 1er jour; ajout d'une ration alimentaire dans le sol; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée.
9	Comme le 1er jour.
10	Comme le 3e jour.

▼**M4**

Jour	Activité
11	Comme le 1er jour.
12 – 13	Comme le 3e jour.
14	Comme le 1er jour; ajout d'une ration alimentaire dans le sol; mesure de la température et du pH du sol; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai; fin de la phase d'absorption; transfert des vers des réplicats exposés restants vers des récipients contenant du sol propre pour la phase d'élimination (sans purge de l'intestin); échantillonnage du sol et des vers des témoins au solvant.
	Les activités préalables à l'exposition (phase d'équilibration) sont programmées en tenant compte des propriétés de la substance d'essai.
	Les activités décrites pour le 3e jour sont réalisées quotidiennement (au moins les jours ouvrés)

▼M4

Appendice 4

Sol artificiel – recommandations pour la préparation et le stockage

Les sols naturels provenant d'une source particulière ne sont pas toujours disponibles tout au long de l'année, et des organismes indigènes ainsi que la présence de micropolluants peuvent influer sur l'essai; il est donc recommandé d'utiliser un substrat artificiel, le sol artificiel décrit au chapitre C.8 de la présente annexe, Toxicité pour les vers de terre (48). Plusieurs espèces d'essai peuvent survivre, se développer et se reproduire dans ce sol, et une normalisation maximum doublée d'une comparabilité intra- et interlaboratoire des conditions d'essai et d'élevage est proposée.

Constituants du sol:

Tourbe:	10 %	Tourbe de sphaigne, conformément à la ligne directrice 207 de l'OCDE (48).
Sable quartzique:	70 %	Sable quartzique industriel (séché à l'air); taille des grains: plus de 50 % des particules seront dans une fourchette comprise entre 50 et 200 μm, mais toutes seront ≤ 2 mm.
Argile kaolinique:	20 %	Teneur en kaolinite ≥ 30 %.
Carbonate de calcium:	≤ 1 %	$CaCO_3$, pulvérisé, chimiquement pur.

Il est également possible de réduire la teneur en carbone organique du sol artificiel, notamment en abaissant la teneur en tourbe à 4-5 % de sol sec et en augmentant la teneur en sable en conséquence. Cette réduction de la teneur en carbone organique est susceptible de diminuer les possibilités d'adsorption de la substance d'essai sur le sol (carbone organique) et d'augmenter la disponibilité de la substance d'essai pour les vers (74). Il a été démontré que *Enchytraeus albidus* et *Eisenia fetida* peuvent satisfaire aux critères de validité concernant la reproduction lorsqu'ils sont testés sur des sols naturels dont la teneur en carbone organique est inférieure (2,7 %, par exemple) (33) et (61), et on a constaté expérimentalement qu'il pouvait en aller de même sur un sol artificiel renfermant 5 % de tourbe.

Préparation

Les constituants secs du sol sont soigneusement mélangés (par exemple, dans un grand mélangeur de laboratoire). Ce mélange est réalisé environ une semaine avant le début de l'essai. Le mélange sec de constituants du sol est humidifié avec de l'eau désionisée au moins 48 h avant l'application de la substance d'essai de manière à équilibrer/stabiliser l'acidité. Pour déterminer le pH, on utilisera un mélange de sol et d'une solution de 1 M KCl suivant un rapport de 1/5. Si le pH ne se trouve pas dans la plage requise (6,0 ± 0,5), soit on ajoute au sol une quantité suffisante de $CaCO_3$, soit on prépare un nouveau lot de sol.

La capacité maximale de rétention d'eau (CRE) du sol artificiel est déterminée conformément à la norme ISO 11268-2 (35). Au moins deux jours avant de démarrer l'essai, on humidifie le sol artificiel sec en ajoutant suffisamment d'eau désionisée ou reconstituée pour obtenir approximativement la moitié de la teneur finale en eau. Cette teneur finale en eau devrait représenter 40 % à 60 % de la CRE maximale. Au début de l'essai, on divise le sol préalablement humidifié en lots d'un nombre égal à celui des concentrations d'essai et des témoins utilisés pour l'essai, et, en employant la solution de la substance d'essai et/ou en ajoutant de l'eau désionisée ou reconstituée, on ajuste le taux d'humidité pour qu'il se trouve entre 40 et 60 % de la CRE_{max}. Le taux d'humidité est déterminé au début et à la fin de l'essai (à 105 °C). Il sera optimal pour satisfaire les exigences des espèces (le taux d'humidité peut aussi être contrôlé comme suit: le sol légèrement pressé dans la main doit laisser apparaître de petites gouttes d'eau entre les doigts).

▼M4

Stockage

Les constituants secs du sol artificiel peuvent être stockés à température ambiante jusqu'à leur utilisation. Le sol préparé, préhumidifié peut être stocké dans un endroit frais pendant maximum trois jours avant d'être chargé; il convient de veiller à minimiser l'évaporation de l'eau. Un sol chargé avec la substance d'essai sera utilisé immédiatement, sauf si des informations spécifient qu'il est possible de stocker ce sol sans affecter la toxicité et la biodisponibilité de la substance d'essai. Des échantillons de sol chargé peuvent alors être stockés dans les conditions recommandées pour la substance d'essai donnée jusqu'à l'analyse.

▼M4

Appendice 5

Espèces d'oligochètes terrestres recommandées pour les essais de bioaccumulation dans le sol

Vers de terre

L'espèce d'essai recommandée est *Eisenia fetida* (Savigny, 1826), qui appartient à la famille des *Lumbricidae*. Depuis 1972, on la divise en deux sous-espèces [*Eisenia fetida* et *Eisenia andrei* (10)]. Selon Jaenike (36), il s'agit là de deux espèces à part entière. *Eisenia fetida* est facilement reconnaissable à ses larges bandes jaunes entre les segments alors qu'*Eisenia andrei* présente une couleur rouge foncé uniforme. Probablement originaires de la région de la mer Noire, elles sont aujourd'hui présentes partout dans le monde, surtout dans les habitats modifiés par les activités anthropiques comme les tas de compost. Toutes deux se prêtent à la réalisation d'essais écotoxicologiques et d'essais de bioaccumulation.

Eisenia fetida et *Eisenia andrei* sont disponibles dans le commerce, notamment comme appât pour la pêche. Par rapport à d'autres vers de terre de la même famille, ces deux espèces ont un cycle de vie court et atteignent leur maturité en 2 à 3 mois (à température ambiante). Leur température optimale oscille entre 20 et 24 °C. Elles préfèrent les substrats relativement humides, d'un pH presque neutre et à forte teneur en matière organique. Ces espèces étant largement utilisées dans les essais écotoxicologiques normalisés depuis environ 25 ans, leur élevage est bien établi (48) (77).

Ces deux espèces peuvent être élevées dans des déjections animales très diverses. Le milieu d'élevage recommandé par l'ISO (35) est un mélange 50/50 de crottin de cheval ou de bouse de vache et de tourbe. Le milieu aura un pH d'environ 6 à 7 (ajusté avec du carbonate de calcium), une faible conductivité ionique (une concentration de sels inférieure à 0,5 % ou à 6 mS/cm) et ne sera pas trop contaminé par de l'ammoniac ou des urines animales. Il est également possible d'utiliser de la terre de jardin, vendue dans le commerce, qui soit sans additifs, un sol artificiel tel que défini par l'OCDE (48), ou encore un mélange des deux, à parts égales (50/50). Le substrat sera humide, mais pas mouillé. Des boîtes d'élevage d'une capacité de 10 à 50 litres conviennent.

Pour obtenir une population de vers homogène quant à l'âge et à la masse, il vaut mieux commencer l'élevage avec des cocons. À cet effet, des vers adultes sont ajoutés à une boîte d'élevage qui contient du substrat frais pour produire des cocons. L'expérience a montré qu'une densité démographique d'environ 100 vers adultes par kg de substrat (poids humide) donne de bons taux de reproduction. Après 28 jours, les vers adultes sont retirés. Les vers de terre éclos sont utilisés pour les essais une fois adultes, soit 2 mois plus tard au moins mais pas au-delà de 12 mois.

Les vers des espèces décrites précédemment peuvent être considérés comme sains s'ils se déplacent dans le substrat, ne tentent pas de s'en échapper et se reproduisent continuellement. Une extrémité postérieure qui bouge très lentement ou qui est jaune (s'agissant d'*E. fetida*) indique un épuisement du substrat. Il est alors recommandé d'utiliser du substrat frais et/ou de réduire le nombre d'animaux par boîte.

Références bibliographiques complémentaires

Gerard B.M. (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1-58.

Graff O. (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1-81.

Römbke J., Egeler P., Füll C. (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S. (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49-55.

Satchell J.E. (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180-201.

▼M4

Sims R.W. and Gerard B.M. (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1-171.

Tomlin A.D. (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331-338 pp.

Enchytrées

L'espèce d'essai recommandée est *Enchytraeus albidus*, Henle 1837 (ver blanc). *Enchytraeus albidus* est l'une des plus grosses espèces (jusqu'à 15 mm) de la famille des annélides oligochètes (*Enchytraeidae*) et c'est la plus répandue dans le monde (8). *Enchytraeus albidus* colonise des habitats marins, dulcicoles et terrestres, constitués la plupart du temps de matière organique en décomposition (algues, compost), et fréquente rarement les prairies (42). Le fait qu'il tolère une gamme étendue de conditions écologiques et certaines variations morphologiques indiquent qu'il pourrait exister différentes races.

Enchytraeus albidus est disponible dans le commerce, plus particulièrement sous forme de nourriture pour les poissons. Il convient de vérifier si l'élevage est contaminé par d'autres espèces, généralement plus petites (60). Dans l'affirmative, tous les vers sont lavés à l'eau dans une boîte de Petri. De grands spécimens adultes d'*Enchytraeus albidus* sont ensuite sélectionnés (à l'aide d'un stéréomicroscope) pour commencer un nouvel élevage. Tous les autres vers sont éliminés. Le cycle de vie de ces vers est court puisqu'ils arrivent à maturité entre 33 jours (à 18 °C) et 74 jours (à 12 °C). Seuls les vers ayant été conservés en laboratoire pendant au moins 5 semaines (une génération) sans problème devront être utilisés pour des essais.

D'autres espèces du genre *Enchytraeus* conviennent également, notamment *Enchytraeus luxuriosus*. L'univers de vie de cette espèce est le sol, comme récemment décrit dans (65). Si on utilise d'autres espèces d'*Enchytraeus*, il faut les identifier clairement et justifier ce choix dans le rapport.

L'espèce *Enchytraeus crypticus* (Westheide et Graefe, 1992) appartient au même groupe qu'*E. luxuriosus*. L'existence d'*Enchytraeus crypticus* dans la nature n'est pas certaine, cette espèce n'ayant été décrite que dans les élevages de lombrics et les tas de compost (Römbke, 2003). Par conséquent, on ne connaît pas ses besoins écologiques d'origine. Cependant, des études récemment menées en laboratoire avec différents sols naturels ont confirmé la grande tolérance de cette espèce vis-à-vis de propriétés du sol telles que le pH et la texture (Jänsch *et al.*, 2005). Ces dernières années, cette espèce a souvent été utilisée dans des études écotoxicologiques en raison de sa facilité d'élevage et de mise à l'essai (Kuperman *et al.*, 2003). Néanmoins, elle est petite (3-12 mm; 7 mm en moyenne) (Westheide et Müller, 1996), ce qui la rend plus difficile à manipuler qu'*Enchytraeus albidus*. Si on utilise cette espèce et non *Enchytraeus albidus*, les récipients d'essai peuvent être de plus petite taille, mais cela n'est pas nécessaire. En outre, il convient de considérer que cette espèce se reproduit très rapidement, son temps de génération étant inférieur à 20 jours à 20 ± 2 °C (Achazi *et al.*, 1999), voire encore plus court à des températures supérieures.

Les *Enchytraeidae* de l'espèce *Enchytraeus albidus* (comme d'autres espèces d'enchytrées) peuvent être élevés dans de grandes boîtes en plastique (par exemple: 30 × 60 × 10 cm ou 20 × 12 × 8 cm, ce qui convient à la culture de vers de petite taille) remplies d'un mélange de sol artificiel et d'une terre de jardin, vendue dans le commerce, non contaminée et sans additifs. L'emploi de compost, qui risque de contenir des substances toxiques, telles que des métaux lourds, est à éviter. La faune est retirée du sol d'élevage avant usage par triple congélation. Un sol entièrement artificiel est également envisageable, mais le taux de reproduction pourrait être moindre par rapport à celui obtenu avec des substrats mixtes. Il convient que le substrat présente un pH de 6,0 ± 0,5. Les vers sont conservés dans un incubateur à une température de 15 ± 2 °C sans lumière. Dans tous les cas, il convient d'éviter une température supérieure à 23 °C. Ce sol artificiel/naturel sera humide, mais pas mouillé. Légèrement pressé dans la main, il laissera apparaître de petites gouttes d'eau. Dans tous les cas, on évite de créer des conditions anoxiques (si on utilise un couvercle, ce dernier devra comporter un nombre de trous suffisamment élevé pour assurer un échange d'air approprié). Il convient d'aérer le sol d'élevage en le remuant délicatement une fois par semaine.

▼M4

Les vers sont nourris au moins une fois par semaine ad libitum avec des flocons d'avoine placés dans une cavité à la surface du sol et recouverte de sol. Si de la nourriture reste de la fois précédente, il convient d'ajuster la ration alimentaire à ajouter. Si la nourriture restante est infestée de champignons, elle est remplacée par une nouvelle ration de flocons d'avoine. Pour favoriser la reproduction, les flocons d'avoine peuvent être remplacés toutes les deux semaines par une poudre protéique du commerce, enrichie en vitamines. Après trois mois, les animaux sont transférés vers un substrat d'élevage fraîchement préparé. Les flocons d'avoine, qui sont conservés dans des récipients hermétiquement fermés, sont passés à l'autoclave ou chauffés avant l'emploi afin de prévenir toute infection par des acariens de stockage (*Glycyphagus* sp., Astigmata, Acarina, par exemple) ou des acariens prédateurs [*Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina, par exemple]. Une fois désinfectée, la nourriture est moulue de façon à pouvoir être facilement parsemée à la surface du sol. Il est également possible de nourrir les vers avec de la levure de boulanger ou de la nourriture pour poissons Tetra-Min®.

En règle générale, les conditions d'élevage sont satisfaisantes si les vers ne tentent pas de quitter le substrat, se déplacent rapidement dans le sol, présentent une surface brillante sur laquelle les particules de sol n'adhèrent pas, ont une couleur plus ou moins blanchâtre, et représentent diverses tranches d'âge. On peut considérer que les vers sont sains s'ils se reproduisent continuellement.

Références bibliographiques complémentaires

Achazi R.K., Fröhlich E., Henneken M., Pilz C. (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117-126.

Jänsch S., Amorim M.J.B., Römbke J. (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51-83.

Kuperman R.G., Checkai R.T., Simini M., Phillips C.T., Kolakowski J.E., Kurnas C.W., Sunahara G.I. (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651-656.

Römbke J. (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607-616.

Westheide W. and Graefe U. (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479 – 488.

Westheide W. and Müller M.C. (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263-267.

▼M6

C.31. ESSAI SUR PLANTE TERRESTRE: ESSAI D'ÉMERGENCE DE PLANTULES ET DE CROISSANCE DE PLANTULES

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 208 (2006) pour les essais de produits chimiques de l'OCDE. Les méthodes d'essai sont régulièrement révisées pour tenir compte des progrès scientifiques et de l'adéquation à la pratique réglementaire. La présente méthode d'essai mise à jour a pour objet d'évaluer les effets potentiels de substances chimiques sur l'émergence et la croissance de plantules. Elle ne couvre pas pour autant tous les effets chroniques ni tous les effets sur la reproduction (c'est-à-dire la grenaison, la formation de fleurs, la maturation des fruits). Il est impératif de tenir compte des conditions d'exposition et des propriétés de la substance de l'essai pour garantir l'utilisation de procédés d'essai appropriés (par exemple, lors de l'essai de métaux et de composés métalliques, il convient de prendre en compte les effets de pH et des contre-ions associés) (1). La présente méthode d'essai ne concerne pas les plantes exposées à des vapeurs de substances chimiques. Elle s'applique aux essais de produits chimiques généraux, aux biocides et aux produits de protection des cultures (également désigné par produits phytosanitaires ou pesticides). Elle s'inspire de procédés existants (2) (3) (4) (5) (6) (7). D'autres références en lien avec les essais sur plantes ont également été consultées (8) (9) (10). L'Appendice 1 présente les définitions utilisées.

PRINCIPE DE L'ESSAI

2. Le test évalue les effets d'une exposition à la substance chimique d'essai contenue dans le sol (ou une autre matrice de sol appropriée) sur l'émergence des plantules et le début de croissance des plantes supérieures. Les semences sont placées au contact d'un sol traité par la substance chimique d'essai, dont les effets sont évalués au bout d'environ 14 à 21 jours après émergence de 50 % des plantules dans le groupe témoin. Les points finals mesurés représentent l'évaluation visuelle de l'émergence des plantules, le poids sec des pousses (ou bien le poids frais des pousses) et dans certains cas la hauteur des pousses, ainsi que l'évaluation des effets nocifs visibles sur différentes parties de la plante. Ces mesures et observations sont comparées à celles réalisées sur des plantes témoins non traitées.

3. Selon la voie d'exposition probable, la substance chimique d'essai est incorporée dans le sol (ou éventuellement dans une matrice de sol artificiel) ou bien appliquée sur la surface du sol, ce qui représente précisément la voie potentielle d'exposition au produit chimique. La substance est incorporée dans le sol par traitement du sol brut. Après l'application, le sol est transféré dans des pots, puis les graines de l'espèce de plante donnée sont plantées dans le sol. Dans les cas d'application en surface, le produit chimique est appliqué sur le sol en pots dans lequel les graines ont déjà été plantées. Les unités d'essai (témoins et sols traités plus graines) sont ensuite placées dans des conditions appropriées favorisant la germination et/ou la croissance des plantes.

4. Selon l'objectif visé par l'étude, l'essai peut permettre de déterminer la courbe dose-réponse, ou il peut être mis en œuvre à une unique concentration ou un unique taux, et il s'agit alors d'un essai de seuil. Si les résultats de l'essai sur une seule concentration ou un seul taux excèdent un certain seuil de toxicité (par exemple, lorsque des effets supérieurs à x % sont observés), on procède à un essai de détermination de l'ordre de grandeur afin de définir les limites de toxicité supérieures et inférieures, puis à un essai employant plusieurs concentrations ou taux afin de tracer une courbe dose-réponse. Une analyse statistique appropriée permet de calculer une concentration efficace CE_x ou un taux d'application efficace TE_x (par exemple CE_{25}, TE_{25}, CE_{50}, TE_{50}), pour le paramètre ou les paramètres pertinents les plus sensibles. Cet essai peut également fournir les valeurs calculées de concentration sans effet observé (CSEO) et de concentration minimale avec effet observé (CMEO).

INFORMATION SUR LA SUBSTANCE CHIMIQUE D'ESSAI

5. La détermination de la voie d'exposition probable de la substance chimique, et par conséquent la conception de l'essai pourront s'appuyer sur les informations suivantes: formule développée, pureté, solubilité dans

▼M6

l'eau, solubilité dans les solvants organiques, coefficient de partage n-octanol/eau, comportement de sorption par le sol, pression de vapeur, stabilité chimique vis-à-vis de l'eau et de la lumière et biodégradabilité.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

6. Pour valider l'essai, les critères de performance suivants devront être satisfaits par les témoins:

— L'émergence des plantules atteint au moins 70 %;

— les plantes ne présentent aucun effet phytotoxique visible (par exemple, chlorose, nécrose, flétrissement, déformation des feuilles et des tiges). Seules des variations normales de la croissance et de la morphologie de l'espèce particulière de plantes sont observées;

— le taux de survie moyen des plantules témoins émergées est d'au moins 90 % pendant la durée de l'étude;

— les conditions environnementales pour une espèce particulière sont identiques et les milieux de croissance contiennent la même quantité de matrice de sol, de milieu de support ou de substrat provenant de la même source.

SUBSTANCE CHIMIQUE DE RÉFÉRENCE

7. L'essai d'une substance chimique de référence à intervalles réguliers permet de vérifier la régularité des performances de l'essai et de la réponse des plantes particulières de l'essai, ainsi que des conditions d'essai. Il est également possible d'utiliser des mesures historiques de biomasse ou de croissance de témoins pour évaluer les performances du système d'essai dans des laboratoires particuliers et ces mesures peuvent également servir de contrôle de qualité intra-laboratoire.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Sol naturel — Substrat artificiel

8. On peut cultiver les plantes dans des pots contenant un limon sableux, un sable limoneux ou un limon d'argile sableuse dont la teneur en carbone organique peut atteindre 1,5 % (environ 3 % de matières organiques). Un terreau commercial ou un mélange de sol synthétique qui contient jusqu'à 1,5 % de carbone organique conviennent également. Les sols argileux doivent être exclus si la substance chimique de l'essai a une affinité élevée avérée pour les argiles. Les sols de champs doivent être tamisés pour homogénéiser la taille de particule en dessous de 2 mm et éliminer les particules grossières. Le type et la texture, la proportion de carbone organique, le pH et la teneur en sels mesurée par la conductivité électronique du sol préparé final doivent être enregistrés, et le sol classé conformément à un schéma de classification standard (11). Pour réduire les effets des pathogènes du sol, celui-ci pourra subir une pasteurisation ou un traitement thermique.

9. L'emploi d'un sol naturel peut compliquer l'interprétation des résultats et augmenter la variabilité, du fait de la variation des propriétés physicochimiques et des populations microbiennes. Ces paramètres peuvent modifier la capacité de rétention d'humidité, la capacité de liaison chimique, l'aération et la teneur en nutriment et en oligoéléments. Les fluctuations de ces facteurs physiques s'ajoutent à des variations des propriétés chimiques telles que le pH et le potentiel redox, qui peuvent affecter la biodisponibilité de la substance d'essai (12) (13) (14).

10. Il est inhabituel d'utiliser des substrats artificiels pour les essais de produits phytosanitaires, mais ils peuvent être employés pour les essais de produits chimiques généraux ou lorsqu'il est souhaitable de réduire la variabilité des sols naturels et d'améliorer la comparabilité des résultats de l'essai. Les substrats doivent être composés de matériaux inertes présentant des interactions minimales avec la substance chimique d'essai, le solvant véhicule ou les deux. Des matériaux inertes appropriés qui absorbent très peu la substance

▼M6

d'essai (15), assurant ainsi une disponibilité maximale de la substance pour les plantules par absorption racinaire, sont le sable de quartz lavé par un acide, la laine minérale et les billes de verre (par exemple, de 0,35 à 0,85 mm de diamètre). La vermiculite, la perlite ou d'autres matériaux très absorbants ne conviennent pas. L'apport de nutriments favorisant la croissance végétale évitera aux plantes les stress dus aux carences nutritives, qui seront évaluées, si possible, par des analyses chimiques ou un contrôle visuel des plantes témoins.

Critère de sélection de l'espèce de l'essai

11. L'espèce sélectionnée devra être raisonnablement répandue, par exemple, en termes de diversité taxonomique dans le royaume végétal, de distribution, d'abondance, de caractéristiques du cycle vital spécifique de l'espèce et de régions d'occurrence naturelle, pour permettre le développement d'une série de réponses (8) (10) (16) (17) (18) (19) (20). Le choix devra tenir compte des caractéristiques suivantes des espèces d'essai envisagées:

— Les semences de l'espèce sont uniformes, et largement disponibles auprès de sources de semences standard fiables, et produisent une germination régulière, fiable et uniforme, ainsi qu'une croissance uniforme des plantules;

— La plante est adaptée à l'essai au laboratoire, et susceptible de donner des résultats fiables et reproductibles dans une même installation d'essai et entre des installations d'essai différentes;

— La sensibilité de l'espèce d'essai doit correspondre aux réponses des plantes se trouvant dans l'environnement exposé à la substance;

— L'espèce a déjà été utilisée dans des essais de toxicité antérieurs de quelque ampleur, et son comportement, par exemple dans des essais biologiques d'herbicides, le criblage de métaux lourds, des essais de stress salin ou minéral ou des études d'allélopathie indique une sensibilité à une large gamme d'agents stressants;

— elle est compatible avec les conditions de croissance du procédé de l'essai;

— elle se conforme aux critères de validité de l'essai.

Certaines des espèces les plus couramment utilisées dans le passé sont indiquées dans l'Appendice 2 et des espèces non cultivées potentielles dans l'Appendice 3.

12. Le nombre d'espèces à inclure dans l'essai dépend des exigences réglementaires en vigueur et n'est par conséquent pas spécifié dans la présente méthode d'essai.

Application de la substance chimique d'essai

13. La substance chimique doit être appliquée dans un support approprié (par exemple eau, acétone, éthanol, polyéthylène glycol et gomme arabique). Il est également possible de tester des mélanges (produits préparés ou préparations) contenant les ingrédients actifs et divers adjuvants.

Incorporation dans le sol ou dans le substrat artificiel

14. Les substances chimiques hydrosolubles ou en suspension dans l'eau peuvent être ajoutées à de l'eau, et la solution est ensuite mélangée avec du sol à l'aide d'un dispositif de mélange approprié. Ce type d'essai peut convenir pour une exposition au produit chimique par le sol ou par l'eau de porosité et lorsqu'il y a un risque d'absorption racinaire. La quantité de la substance chimique d'essai ajoutée ne doit pas excéder la capacité de rétention d'eau du sol. Le volume d'eau ajouté doit être identique pour chaque concentration de l'essai, tout en restant limité afin d'éviter la formation d'amas de sol aggloméré.

▼M6

15. Les substances chimiques à faible solubilité dans l'eau doivent être dissoutes dans un solvant volatile approprié (par exemple acétone, éthanol) et mélangées à du sable. Il est possible de retirer ensuite le solvant du sable à l'aide d'un courant d'air sous agitation continue du sable. Le sable traité est ensuite mélangé avec le sol expérimental. Un second témoin constitué seulement de sable ou de solvant est préparé. Les traitements à différentes doses et le second témoin reçoivent des quantités égales de sable duquel le solvant a été mélangé puis ôté. Dans le cas de substances chimiques d'essai solides insolubles, le mélange de sol sec et de produit chimique est préparé dans un dispositif de mélange approprié. Ensuite, le sol est ajouté aux pots et les graines y sont immédiatement semées.

16. Lorsqu'un substrat artificiel remplace le sol, les produits chimiques solubles dans l'eau peuvent être dissous dans la solution nutritive juste avant le début de l'essai. Les produits chimiques insolubles dans l'eau, mais qu'il est possible de mettre en suspension dans l'eau grâce à un support de solvant, sont ajoutés avec le support à la solution nutritive. Les produits chimiques insolubles dans l'eau pour lesquels il n'existe aucun support hydrosoluble non toxique doivent être dissous dans un solvant volatil approprié. La solution mélangée avec du sable ou des billes de verre est placée dans un appareil rotatif sous vide et évaporée, en formant un revêtement uniforme de produit chimique sur le sable ou les billes. Une portion tarée de billes est extraite par le même solvant organique et le produit chimique de l'essai dosé avant de remplir les pots.

Application en surface

17. Dans le cas de produits phytosanitaires, l'application de la solution d'essai se fait souvent par pulvérisation sur la surface du sol d'une solution d'essai. Le modèle et la capacité de tous les équipements utilisés pour conduire l'essai, en particulier les appareils utilisés pour préparer et administrer la substance chimique d'essai, doivent permettre sa mise en œuvre précise, avec une couverture reproductible. Celle-ci doit être uniforme sur les surfaces de sol. On s'efforcera d'éviter d'éventuelles interactions par absorption ou réaction des produits chimiques avec le matériel (par exemple, tubes de plastique et produits chimiques, composants ou éléments en acier). La pulvérisation de la substance chimique d'essai sur la surface de sol simule des applications par pulvérisations usuelles. En général, les volumes pulvérisés se situent dans l'intervalle utilisé en pratique agronomique normale et ils doivent être notés (quantité d'eau etc.). Le type de buse choisi doit permettre de couvrir uniformément la surface de sol. Dans le cas d'applications de solvants ou de supports, un second groupe de plantes témoins est mis en place et ne reçoit que le solvant ou le support, sauf pour les produits phytosanitaires testés sous forme de formulations.

Vérification de la concentration ou du taux de substance chimique d'essai

18. Les concentrations ou les taux d'application doivent être confirmés par une vérification analytique appropriée. L'analyse de la concentration la plus élevée de solutions d'essai, associée au relevé des dilutions consécutives et à l'utilisation d'applicateurs étalonnés (par exemple, verrerie analytique étalonnée, étalonnage du pulvérisateur) confirmera éventuellement la vérification des concentrations et les taux de l'essai pour substances chimiques solubles. Pour les substances chimiques insolubles, la vérification devra s'appuyer sur les poids de substance chimique d'essai ajoutés au sol. L'analyse du sol peut être nécessaire dans le cas où l'homogénéité de l'application doit être démontrée.

RÉALISATION DE L'ESSAI

Modèle de l'essai

19. Des graines de la même espèce sont semées en pots. Le nombre de graines par pot dépend de l'espèce, de la taille du pot et de la durée de l'essai, et doit garantir des conditions de croissance adéquates et uniformes et éviter la surpopulation pendant la durée de l'essai. La densité maximale de graines est d'environ 3 à 10 graines par cm2, selon la taille des graines. Par exemple, des densités d'un ou deux plants de maïs, de soja, de tomate, de concombre ou de betterave à sucre par récipient de 15 cm, de trois plants de colza ou de pois par récipient de 15 cm et de 5 à 10 graines d'oignons, de blé ou d'autres petites graines par récipient de 15 cm sont recommandées. Le nombre de graines et de répliques de pots (une réplique correspond à un pot, et par

▼M6

conséquent les plantes dans un même pot ne peuvent faire fonction de répliques) doit satisfaire aux conditions d'une analyse statistique optimale (21). Il convient de noter que la variabilité augmente pour les espèces d'essai à grosses graines dont on n'utilise moins de graines par pot (réplique) par rapport à des espèces d'essai pour lesquelles il est possible d'utiliser des nombres plus élevés de petites graines par pot. En plantant un nombre égal de graines dans chaque pot, cette variabilité diminue.

20. L'utilisation de groupes de contrôle permet de confirmer que les effets observés ne peuvent être associés ou attribués qu'à l'exposition à la substance chimique d'essai. Le groupe de contrôle approprié doit être identique sous tous rapports avec le groupe d'essai, à l'exception de l'exposition à la substance chimique d'essai. Dans un essai donné, toutes les plantes de l'essai, y compris les témoins devront provenir de la même source. Pour éliminer tout biais, une répartition aléatoire des pots d'essai et témoins est indispensable.

21. Il convient d'éviter l'emploi de graines recouvertes d'un insecticide ou d'un fongicide (c'est à dire les graines enrobées). Toutefois, l'utilisation de certains fongicides de contact non systémiques (par exemple captan, thiram) est autorisée par certaines autorités réglementaires (22). Le problème éventuel des pathogènes disséminés par les semences peut être résolu par une brève immersion des semences dans une solution d'hypochloride à 5 %, suivie d'un rinçage abondant à l'eau courante et d'un séchage. Aucun autre traitement curatif par des produits phytosanitaires n'est autorisé.

Conditions de l'essai

22. Les conditions de l'essai doivent être aussi proches que possible des conditions nécessaires à la croissance normale ou des conditions environnementales habituelles pour l'espèce et les variétés testées (voir par exemple Appendice 4). Les plantes émergentes doivent être entretenues par de bonnes pratiques horticoles dans des chambres à environnement contrôlé, des phytotrons ou des serres. Si l'on dispose des installations adéquates, ces pratiques comprennent habituellement le contrôle et l'enregistrement suffisamment fréquents (par exemple quotidien) de la température, de l'humidité, de la concentration de dioxyde de carbone, des variables de luminosité (intensité, longueur d'onde, domaine de longueur d'onde autorisant la photosynthèse) et de la périodicité lumineuse, du fonctionnement des dispositifs d'arrosage, etc, permettant d'assurer une croissance satisfaisante de la plante estimée par l'observation des plantes témoins. Les températures de serre sont contrôlées par des systèmes de ventilation, de chauffage et/ou de refroidissement. Les conditions suivantes sont généralement recommandées pour les essais en serre:

— température: 22 °C ± 10 °C;

— humidité: 70 % ± 25 %;

— photopériode: 16 heures de lumière au minimum;

— intensité lumineuse: 350 ± 50 $\mu E/m^2/s$. Un éclairage d'appoint peut être nécessaire si l'intensité descend en dessous de 200 $\mu E/m^2/s$, longueur d'onde 400-700 nm, sauf pour certaines espèces dont les exigences en lumière sont moindres.

Les conditions environnementales doivent être contrôlées et notées pendant la durée de l'étude. Les plantes sont cultivées dans des pots en plastique non poreux ou émaillé posés sur une clayette ou une soucoupe. On peut les

▼M6

déplacer périodiquement pour diminuer la variabilité de croissance entre plantes (provoquées par des différences de conditions d'essai dans les installations de culture). La taille des pots doit être suffisante pour une croissance.

23. Des suppléments peuvent compléter les nutriments du sol pour assurer une bonne vigueur végétale. Les besoins en nutriments et le calendrier de leur addition sont déterminés par l'observation des plantes témoins. Il est recommandé d'alimenter en eau par le fond des récipients d'essai (par exemple, en utilisant des mèches en fibres de verre). Toutefois, un arrosage initial par le haut peut stimuler la germination des graines et faciliter le déplacement du produit chimique dans le sol lors d'une application sur la surface du sol.

24. Les conditions de croissance spécifiques doivent être adaptées à l'espèce d'essai et à la substance chimique d'essai à l'étude. Il faut maintenir les plantes témoins et traitées dans les mêmes conditions environnementales, et prendre par conséquent des dispositions pour empêcher une exposition croisée (par exemple par des substances volatiles) entre différents traitements, et une exposition des témoins à la substance chimique d'essai.

Essais à une seule concentration ou un seul taux

25. Plusieurs facteurs prévalent lorsque l'on cherche à déterminer la concentration ou le taux approprié d'une substance dans le cadre d'un essai à une seule concentration ou un seul taux (stimulation/limite). Ils comprennent les propriétés physiques et chimiques de la substance, lorsqu'il s'agit de substances chimiques à usage général. Pour les produits phytosanitaires, il convient de tenir compte des propriétés physico-chimiques et du régime d'utilisation de la substance chimique d'essai, de sa concentration ou de son taux maximal, du nombre d'applications par saison et/ou de la persistance de la substance chimique d'essai. La détermination d'éventuelles propriétés phytotoxiques d'un produit chimique général peut demander la mise en œuvre de l'essai à une teneur maximale de 1 000 mg/kg de sol sec.

Essai de détermination de l'ordre de grandeur

26. Le cas échéant, un essai de détermination de l'ordre de grandeur peut contribuer à fixer la concentration ou le taux d'application à expérimenter dans l'étude dose-réponse définitive. Dans un tel essai, les concentrations ou les taux à tester sont largement espacés (par exemple 0,1, 1,0, 10, 100 et 1 000 mg/kg de sol sec). Dans le cas de produits phytosanitaires, on peut calculer les concentrations ou les taux à partir de la concentration ou du taux d'application recommandé ou maximal, par exemple, 1/100, 1/10, ou 1 fois la concentration ou le taux d'application recommandé ou maximal.

Essais à plusieurs concentrations ou taux d'application

27. L'objectif d'un essai à plusieurs concentrations ou taux d'application est l'établissement d'une relation dose-réponse et la détermination d'une valeur de CE_x ou de TE_x lié à l'émergence, à la biomasse et/ou à des effets visuels par rapport à des témoins non exposés, comme il est exigé par les autorités réglementaires.

28. L'intervalle entre les concentrations ou les taux ainsi que leur nombre doivent être suffisants pour établir une relation dose-réponse et une équation de régression, et obtenir une estimation des CE_x ou des TE_x. Les intervalles de concentration ou de taux doivent englober les valeurs de CE_x ou de TE_x à déterminer. Par exemple, si l'on recherche une CE_{50}, il est préférable de conduire l'essai à des taux produisant un effet de 20 à 80 %. Le nombre recommandé de concentrations ou de taux d'essai pour atteindre cet objectif est d'au moins 5 en série géométrique, plus un témoin non traité, espacés d'un facteur d'au plus trois. Pour chaque groupe de traitement et de contrôle,

▼M6

le nombre de répliques doit être au moins égal à quatre et le nombre total de graines au moins égal à 20. Pour certaines plantes à faible taux de germination ou aux caractéristiques de croissance variables, davantage de répliques peuvent être nécessaires pour augmenter la puissance statistique de l'essai. Lorsque l'on utilise un grand nombre de concentrations ou de taux d'essai, on peut réduire le nombre de répliques. Pour estimer le CSEO, il faut parfois davantage de répliques pour obtenir la puissance statistique adéquate (23).

Observations

29. Pendant la période d'observation, c'est-à-dire 14 à 21 jours après l'émergence de 50 % des plantes témoins (et également des témoins de solvant, le cas échéant), les plantes sont examinées fréquemment (au moins une fois par semaine et si possible une fois par jour) pour enregistrer l'émergence, la phytoxicité visuelle et la mortalité. A la fin de l'essai, le pourcentage d'émergence et la biomasse des plantes survivantes sont mesurés, ainsi que les effets nocifs visibles sur différentes parties de la plante, en particulier des anomalies dans l'apparence des plantules émergées, une croissance avortée, une chlorose, une décoloration, une mortalité et des effets sur le développement végétal. La biomasse finale peut être mesurée par le poids sec moyen des pousses des plantes survivantes, après récolte des pousses à la surface du sol et séchage à masse constante à 60 °C, ou bien par le poids frais des pousses. La hauteur de la pousse peut constituer un autre effet mesuré, parfois exigé par les autorités réglementaires. Il convient d'utiliser une notation homogène des lésions visuelles pour évaluer les réponses toxiques détectables. Des exemples pratiques d'évaluations visuelles qualitatives et quantitatives sont proposés dans les références (23) (24).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Analyse statistique

Essai à une seule concentration ou un seul taux

30. Pour chaque espèce végétale, les données sont analysées en utilisant une méthode statistique appropriée (21). Il convient de noter la valeur d'un effet à la concentration ou au taux de l'essai, ou bien l'incapacité à obtenir un effet donné à la concentration ou au taux de l'essai (par exemple, < *x* % de l'effet observé à la concentration ou au taux *y*).

Essais à plusieurs concentrations ou taux d'application

31. Une relation dose-réponse est établie par une équation de régression. Différents modèles sont applicables, par exemple, pour estimer une CE_x ou un TE_x (par exemple CE_{25}, TE_{25}, CE_{50}, TE_{50}) et leurs limites de confiance pour l'émergence sous forme de résultats tout ou rien, d'unités logit, probit, Weibull, les méthodes de Spearman-Karber et Spearman-Karber abrégées peuvent convenir. Pour évaluer la croissance des plantules (poids et hauteur) en points finals continus, CE_x ou TE_x et leurs limites de confiance peuvent être estimés à l'aide d'une analyse de régression appropriée (par exemple analyse de régression non linéaire Bruce-Versteeg (25)). Autant que possible, la valeur de R^2 sera supérieure ou égale à 0.7 pour les espèces les plus sensibles et les concentrations ou taux d'essai utilisés comprendront les effets à 20 % et à 80 %. Dans la mesure où il faut estimer le CSEO, il est préférable d'appliquer des tests statistiques puissants qui seront choisis en fonction de la distribution des données (21) (26).

Rapport d'essai

32. Le rapport d'essai doit mentionner les résultats des études ainsi qu'une description détaillée des conditions d'essai, une discussion approfondie des résultats, une analyse des données et les conclusions tirées de l'analyse. Un résumé sous forme de tableaux et une synthèse des résultats sont proposés. Le rapport doit comporter les informations suivantes:

▼**M6**

Substance chimique d'essai:

— données d'identification de la substance chimique, propriétés pertinentes de la substance d'essai (par exemple log P_{ow}, solubilité dans l'eau, pression de vapeur et informations sur le devenir et le comportement dans l'environnement lorsqu'elles sont disponibles);

— détails sur la préparation de la solution d'essai et vérification des concentrations d'essai comme il est spécifié dans le paragraphe 18.

Espèces soumises à l'essai:

— détails sur l'organisme expérimental: espèce/variété, familles de plantes, noms scientifiques et communs, source et histoire de la graine aussi détaillées que possible (à savoir, nom du fournisseur, pourcentage de germination, classe de taille de la semence, numéro du lot, année de la semence ou saison de croissance de la récolte, date de l'évaluation de la germination), viabilité, etc.;

— nombre d'espèces monocotylédones et dicotylédones soumises à l'essai;

— justification du choix de l'espèce;

— description du stockage, du traitement et de la maintenance des semences.

Conditions d'essai:

— installation utilisée dans l'essai (par exemple, chambre de croissance, phytotron, serre);

— description du système d'essai (par exemple, dimension des pots, matière des pots et quantité de sol);

— caractéristiques du sol (texture ou type de sol: par exemple distribution et classification des particules du sol, propriétés physiques et chimiques, en particulier pourcentage de matières organiques, pourcentage de carbone organique, pH);

— préparation du sol ou du substrat (par exemple, sol artificiel, sable, et autres) avant l'essai;

— description du milieu nutritif, le cas échéant;

— application de la substance chimique d'essai: description de la méthode d'application, description du matériel, taux d'exposition et volume, en particulier vérification chimique, description de la méthode d'étalonnage, description des conditions environnementales pendant l'application;

— conditions de croissance: intensité lumineuse (par exemple, domaine longueur d'onde autorisant la photosynthèse), photopériode, températures maximales et minimales, régime et procédé d'arrosage, fertilisation;

— nombre de graines par pot, nombre de plantes par dose; nombre de répliques (pots) par taux d'exposition;

— type et nombre de contrôles (témoins négatifs et/ou positifs, témoin de solvant le cas échéant);

— durée de l'essai.

Résultats:

— tableau de tous les effets mesurés pour chaque réplique, taux ou concentration d'essai et espèce;

— pourcentage d'inhibition pour chaque espèce par rapport aux témoins;

— mesures de biomasse (poids sec ou poids frais des pousses) des plantes en pourcentages de témoins;

▼M6

— hauteur des pousses des plantes en pourcentages des témoins, lorsqu'elles ont été mesurées;

— pourcentage de lésions visibles et description qualitative et quantitative des lésions visibles (chlorose, nécrose, flétrissement, déformation des feuilles et des tiges ainsi qu'une absence quelconque d'effet) provoquées par la substance chimique d'essai par rapport aux plantes témoins;

— description de l'échelle d'évaluation utilisée pour estimer les lésions visibles, lorsqu'une évaluation visuelle est rapportée;

— pour les études à un seul taux, le pourcentage de lésions doit être rapporté;

— valeurs CE_x ou TE_x (par exemple CE_{50}, TE_{50}, CE_{25}, TE_{25}) et limites de confiance correspondantes. Pour chaque analyse de régression, l'écart type pour l'équation de régression et l'écart type pour l'estimation des paramètres individuels (par exemple pente, interception) seront fournis;

— valeurs de CSEO (et de CMEO) dans le cas où elles ont été calculées;

— description des protocoles statistiques et des hypothèses adoptées;

— présentation graphique de ces données et relation dose-réponse de l'espèce soumise à l'essai.

Variantes des protocoles décrits dans la présente méthode d'essai et tous les événements inhabituels survenus pendant l'essai.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Schrader G., Metge K., and Bahadir M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. Applied Soil Ecology, 7, 189-193.

(2) Organisation internationale de normalisation. (1993). ISO 11269-1. Qualité du sol -Détermination des effets des polluants sur la flore du sol – Partie 1: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.

(3) Organisation internationale de normalisation. (1995). ISO 11269-2. Qualité du sol -Détermination des effets des polluants sur la flore du sol – Partie 2: Effets des substances chimiques sur l'émergence et la croissance des végétaux supérieurs.

(4) American Standard for Testing Material (ASTM). (2002). E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.

(5) U.S. EPA. (1982). FIFRA, 40CFR, Part 158.540. Subdivision J, Parts 122-1 and 123-1.

(6) US EPA. (1996). OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 850. Ecological Effects Test Guidelines:

— 850,4000: Background — Non-target Plant Testing;

— 850,4025: Target Area Phytotoxicity;

— 850,4100: Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence);

— 850,4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test;

— 850,4225: Seedling Emergence, Tier II;

— 850,4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.

(7) AFNOR X31-201. (1982). Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance. AFNOR X31-203/IS0 11269-1. (1993) Détermination des effets des polluants sur la flore du sol: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.

(8) Boutin, C., Freemark, K.E. and Keddy, C.J. (1993). Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: Non-target plant testing and evaluation. Technical Report Series No. 145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environment Canada, Hull, Québec, Canada.

▼**M6**

(9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C., and Zwerger, P. (1997). Effects of Plant Protection Products on Non-Target Organisms — A contribution to the Discussion of Risk Assessment and Risk Mitigation for Terrestrial Non-Target Organisms (Flora and Fauna). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. No 48.

(10) Hale, B., Hall, J.C., Solomon, K., and Stephenson, G. (1994). A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides; Non-Target Plant Testing and Evaluation, Centre for Toxicology, University of Guelph, Ontario Canada.

(11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sc. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(12) Audus, L.J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. In: Audus, L.J. ed. *The Physiology and biochemistry of Herbicides*, London, New York, Academic Press, NY, Chapter 5, pp. 163-206.

(13) Beall, M.L., Jr. and Nash, R.G. (1969). Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlor from soil, J. Agro. 61:571-575.

(14) Beetsman, G.D., Kenney, D.R. and Chesters, G. (1969). Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247-250.

(15) U.S.Food and Drug Administration (FDA). (1987). Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 pp., FDA, Washington, DC.

(16) McKelvey, R.A., Wright, J.P., Honegger, J.L. and Warren, L.W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. Pest Management Science vol. 58:1161-1174.

(17) Boutin, C.; Elmegaard, N. and Kjær, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. Ecotoxicology vol. 13(4): 349-369.

(18) Boutin, C., and Rogers, C.A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides — An analysis with two databases. Ecotoxicology vol.9(4):255-271.

(19) Boutin, C. and Harper, J.L. (1991). A comparative study of the population dynamics of five species of *Veronica* in natural habitats. J. Ecol. 9:155-271.

(20) Boutin, C., Lee, H.-B., Peart, T.E., Batchelor, S.P. and Maguire, R.J... (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Envir. Toxicol. Chem. 19 (10): 2532-2541.

(21) OCDE (2006). Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Série sur les essais et l'évaluation n° 54, Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(22) Hatzios, K.K. and Penner, D. (1985). Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. Rev. Weed Sci. 1:1-63.

(23) Hamill, P.B., Marriage, P.B. and G. Friesen. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. Weed Science 25:386-389.

(24) Frans, R.E. and Talbert, R.E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. In: B. Truelove (Ed.) Research Methods in Weed Science, 2nd ed. Southern weed Science Society, Auburn, 15-23.

(25) Bruce, R.D. and Versteeg, D. J.(1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. Environmental Toxicology and Chemistry 11, 1485-1492.

(26) Chapitre C.33 de la présente annexe: Essai de reproduction chez le lombric (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*).

▼M6

Appendice 1

Définitions

Ingrédient actif (i.a.) [ou substance active (s.a.)]: matériau destiné à exercer un effet biologique spécifique (par exemple, lutte contre les insectes, contre les maladies végétales, contre les mauvaises herbes, dans la zone de traitement), également désigné par ingrédient actif ou substance active de qualité technique,

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Produits phytosanitaires ou pesticides: matériaux dotés d'une activité biologique spécifique utilisés intentionnellement pour protéger les plantes cultivées contre les nuisibles (par exemple, maladies fongiques, insectes, plantes compétitrices).

CE_x · concentration efficace à x % ou TE_x. taux efficace à x %: concentration ou taux qui provoque un changement ou une altération indésirable de x % de l'effet mesuré de l'essai par rapport au témoin (par exemple, une réduction de 25 % ou de 50 % de l'émergence des plantules, du poids des pousses, du nombre final de plantes présentes ou une augmentation de 25 % ou de 50 % d'une lésion visuelle constituent respectivement une CE_{25}/TE_{25} ou une CE_{50}/TE_{50}).

Émergence: apparition du coléoptile ou du cotylédon au-dessus de la surface du sol.

Formulation: produit formulé commercial contenant la substance active (ingrédient actif), que l'on appelle également préparation finale ([1]) ou produit final typique.

CMEO (concentration minimale avec effet observé): concentration la plus faible de la substance chimique d'essai à laquelle a été observé l'effet. Dans cet essai, la concentration correspondant à la CMEO a un effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) pendant une durée d'exposition donnée par rapport au témoin, et est supérieure à la valeur de CSEO.

Plantes non visées: plantes situées hors de la zone contenant les plantes visées. Pour les produits phytosanitaires, ce terme se réfère généralement à des plantes situées hors de la surface de traitement.

CSEO (concentration sans effet observé): concentration la plus élevée de substances d'essai à laquelle aucun effet n'est observé. Dans cet essai, la concentration correspondant à la CSEO n'a pas d'effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) pendant une durée d'exposition donnée lorsqu'on la compare au témoin.

Phytotoxicité: anomalies préjudiciables (selon des mesures et des évaluations visuelles) par rapport à l'apparence et au modèle de croissance normaux des plantes, qui apparaissent en réponse à une substance chimique donnée.

Réplique: unité expérimentale qui représente le groupe de contrôle et/ou le groupe de traitement. Dans ces études, la réplique est définie par un pot.

Évaluation visuelle: appréciation des dommages visuels d'après l'observation du port de la plante, de sa vigueur, de malformations, d'une chlorose, d'une nécrose et de l'apparence globale par rapport à un témoin.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

([1]) Préparation finale: produit formulé contenant la substance active (l'ingrédient actif) vendu dans le commerce.

▼**M6**

Appendice 2

Liste des espèces habituellement utilisées dans les essais sur plantes

Famille	Espèces	Noms vulgaires
DICOTYLEDONAE		
Apiaceae (Umbelliferae)	*Daucus carota*	Carotte
Asteraceae (Compositae)	*Helianthus annuus*	Tournesol
Asteraceae (Compositae)	*Lactuca sativa*	Laitue
Brassicaceae (Cruciferae)	*Sinapis alba*	Moutarde blanche
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica campestris* var. *chinensis*	Chou chinois
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica napus*	Colza
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica oleracea* var. *capitata*	Chou
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica rapa*	Navet
Brassicaceae (Cruciferae)	*Lepidium sativum*	Cresson alénois
Brassicaceae (Cruciferae)	*Raphanus sativus*	Radis
Chenopodiaceae	*Beta vulgaris*	Betterave à sucre
Cucurbitaceae	*Cucumis sativa*	Concombre
Fabaceae (Leguminosae)	*Glycine max (G. soja)*	Soja
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus aureus*	Haricot mungo
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus vulgaris*	Haricot
Fabaceae (Leguminosae)	*Pisum sativum*	Pois
Fabaceae (Leguminosae)	*Trigonella foenum-graecum*	Fenugrec
Fabaceae (Leguminosae)	*Lotus corniculatus*	Lotier corniculé
Fabaceae (Leguminosae)	*Trifolium pratense*	Trèfle des prés
Fabaceae (Leguminosae)	*Vicia sativa*	Vesce cultivée
Linaceae	*Linum usitatissimum*	Lin
Polygonaceae	*Fagopyrum esculentum*	Sarasin
Solanaceae	*Solanum lycopersicon*	Tomate

▼**M6**

Famille	Espèces	Noms vulgaires
MONOCOTYLEDONAE		
Liliaceae (Amaryllada-ceae)	*Allium cepa*	Oignon
Poaceae (Gramineae)	*Avena sativa*	Avoine
Poaceae (Gramineae)	*Hordeum vulgare*	Orge
Poaceae (Gramineae)	*Lolium perenne*	Raygras pérenne
Poaceae (Gramineae)	*Oryza sativa*	Riz
Poaceae (Gramineae)	*Secale cereale*	Seigle
Poaceae (Gramineae)	*Sorghum bicolor*	Sorgho
Poaceae (Gramineae)	*Triticum aestivum*	Blé
Poaceae (Gramineae)	*Zea mays*	Maïs

▼M6

Appendice 3

Liste des espèces non cultivées potentielles

Espèces potentielles selon l'OCDE pour les essais de toxicité sur plantes

Note: Le tableau suivant fournit des informations sur 52 espèces non cultivées (les références sont données entre parenthèses pour chaque entrée). Les taux d'émergence indiqués sont issus de la littérature publiée et ne sont fournis qu'à titre d'indication générale. L'expérience individuelle peut varier en fonction de la source de semence et d'autres facteurs.

FAMILLE Nom botanique de l'espèce (Nom commun français)	Durée de vie [1] et habitat	Poids des graines (mg)	Photopériode pour la germination ou la croissance [2]	Profondeur du semis (mm) [3]	Durée de germination (jours) [4]	Traitements spéciaux [5]	Essai de toxicité [6]	Distributeurs de semences [7]	Autres références [8]
APIACEAE *Torilis japónica* (Torillis du Japon)	A, B zones perturbées, haies, pâturages (16, 19)	1,7 – 1,9 (14, 19).	L = D (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19).	stratification froide (7, 14, 18, 19) une maturation peut être nécessaire (19) germination inhibée par l'obscurité (1, 19) aucun traitement particulier (5)	POST (5)		
ASTERACEAE *Bellis perennis* (Pâquerette vivace)	P prairie, terres arables, gazon (16, 19)	0,09 – 0,17 (4, 19).	L = D (14)	0 4)	3 (50 %) (19). 11 (100 %) (18).	germination non affectée par une irradiation (18, 19) aucun traitement particulier (4, 14)	POST (4)	A, D, F	7
Centaurea cyanus (Bleuet des champs)	A champs, bords de routes, habitats ouverts (16)	4,1 – 4,9 (4, 14).	L = D (14)	0 — 3 (2, 4, 14).	14-21 (100 %) (14)	aucun traitement particulier (2,4)	POST (2,4)	A, D, E, F	7
Centaurea nigra (Centaurée noire)	P champs, bords de routes, habitats ouverts (16, 19)	2,4 – 2,6 (14, 19).	L = D (14)	0 (19)	3 (50 %) (19). 4 (97 %) (18).	une maturation peut être nécessaire (18, 19) germination inhibée par l'obscurité (19) aucun traitement particulier (5, 14, 26)	POST (5, 22, 26)	A	
Inula helenium (Inule aulnée)	P sites humides, perturbés 16)	1 – 1,3 (14, 14, 19).		0 (4, 29)		aucun traitement particulier (4)	POST (4)	A, F	

▼M6

FAMILLE Nom botanique de l'espèce (Nom commun français)	Durée de vie [1] et habitat	Poids des graines (mg)	Photopériode pour la germination ou la croissance [2]	Profondeur du semis (mm) [3]	Durée de germination (jours) [4]	Traitements spéciaux [5]	Essai de toxicité [6]	Distributeurs de semences [7]	Autres références [8]
Leontodon hispidus (Liondent hérissé)	P champs, bords de routes, zones perturbées (16, 19)	0,85 – 1,2 (14, 19).	L = D (14)	0 (19)	4 (50 %) (19). 7 (80 %) (18).	germination inhibée par l'obscurité (17, 18, 19) aucun traitement particulier (5, 23)	POST (5, 22, 23)		
Rudbeckia hirta (Rudbeckie hérissée)	B, P perturbé (16)	0,3 (4, 14)	L = D (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	aucun traitement particulier (4, 14, 33)	POST (4, 33)	C, D, E, F	
Solidago canadensis (Solidage du Canada)	P pâturages, zones ouvertes (16)	0,06 – 0,08 (4, 14).	L = D (11)	0 (4)	14-21 11)	mélanger avec une quantité égale de sable et tremper dans du GA 500 ppm pendant 24 h (11) aucun traitement particulier (4)	POST (4)	E, F	
Xanthium pensylvanicum	A champs, habitats ouverts (16)	25 – 61 (14, 29)		0(1) 5(29)		la germination peut être inhibée par l'obscurité (1) tremper dans l'eau tiède pendant 12 heures (29)	PRE & POST (31)	A	
Xanthium spinosum (Lampourde épineuse)	A habitats ouverts (16)	200 (14)	L = D (14) L > D (6)	10 (6)		scarification (14) aucun traitement particulier (6)	PRE & POST (6)	A	
Xanthium strumarium (Violette des champs)	A champs, habitats ouverts (16)	67,4 (14)	L = D (14)	10 - 20 (6, 21)		aucun traitement particulier (6, 14, 21)	PRE & POST (6, 21, 28, 31)	A	
BRASSICACEAE *Cardamine pratensis* (Cardamine des prés)	P champs, bords de routes, gazon (16, 19)	0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19). 15 (98 %) (18).	germination inhibée par l'obscurité (18, 19) aucun traitement particulier (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	

▼M6

FAMILLE Nom botanique de l'espèce (Nom commun français)	Durée de vie [1] et habitat	Poids des graines (mg)	Photopériode pour la germination ou la croissance [2]	Profondeur du semis (mm) [3]	Durée de germination (jours) [4]	Traitements spéciaux [5]	Essai de toxicité [6]	Distributeurs de semences [7]	Autres références [8]
CARYOPHYLLACEAE *Lychnis flos-cuculi* (Lychnis fleur de coucou)	P (16)	0,21 (14)	L = D (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	une maturation peut être nécessaire (18) aucun traitement particulier (5, 14, 15, 22-26)	POST (5, 15, 22-26)	F	
CHENOPODIACEAE *Chenopodium album* (Chénopode blanc)	A bordures de champs, zones perturbées (16, 19)	0,7 – 1,5 (14, 19, 34).	L = D (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19).	le traitement diffère en fonction de la couleur de la graine (19) dormance en stockage à sec (19) germination inhibée par l'obscurité (1, 18, 19) stratification froide (18) aucun traitement particulier (14, 34)	PRE & POST (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE *Hypericum perforatum* (Millepertuis perforé)	P champs, terres arables, habitats ouverts (16, 19)	0,1 – 0,23 (14, 19)	L= D (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18).	germination inhibée par l'obscurité (1, 18, 19) aucun traitement particulier (5, 14, 15, 25, 27)	POST (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE *Ipomoea hederacea* (Etoile du matin)	A bords de routes, habitats ouverts, champs de maïs (16)	28,2 (14)	L > D (6, 10)	10-20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	germination non affectée par une irradiation (1) aucun traitement particulier (6, 21)	PRE & POST (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE *Cyperus rotundus* (Souchet rond)	P terres arables, pâturages, bords de routes (16, 30)	0,2 (14)	L= D (14)	0 (1) 10 - 20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	germination inhibée par l'obscurité (1) aucun traitement particulier (6, 10, 14)	PRE & POST (6, 28, 31)	B	7
FABACEAE *Lotus corniculatus* (Lotie corniculé)	P zones herbeuses, bords de routes, habitats ouverts (16, 19)	1-1,67 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	scarification (14, 19) germination non affectée par une irradiation (18, 19) aucun traitement particulier (23, 25)	POST (5, 23, 25)	A, D, E, F	

▼M6

FAMILLE Nom botanique de l'espèce (Nom commun français)	Durée de vie ([1]) et habitat	Poids des graines (mg)	Photopériode pour la germination ou la croissance ([2])	Profondeur du semis (mm) ([3])	Durée de germination (jours) ([4])	Traitements spéciaux ([5])	Essai de toxicité ([6])	Distributeurs de semences ([7])	Autres références ([8])
Senna obtusifolia (Casse fétide)	A bois humide (16)	23-28 (9)	L = D (14) L > D (9)	10-20 (6,9)		tremper les graines humides dans l'eau pendant 24 heures (9) scarification (14) la viabilité des graines dépend de leur couleur (1) aucun traitement particulier (6)	POST (6,9)	A	
Sesbania exaltata (Chanvre)	A sol alluvial (16)	11 – 13 (9, 14)	L > D (9)	10-20 (9, 21)		tremper les graines humides dans l'eau pendant 24 heures (9) germination non affectée par une irradiation (1) aucun traitement particulier (21)	PRE & POST (9, 21, 28, 31)	A	
Trifolium pratense (Trèfle des prés)	P champs, bords de routes, terres arables (16, 19)	1,4 – 1,7 (14, 19)	L= D (14)		1 (50 %) (19)	scarification (14, 18) peut requérir une maturation (19) germination non affectée par une irradiation (1, 19) aucun traitement particulier (5)	POST (5)	A, E, F	
LAMIACEAE *Leonurus cardiaca* (Agripaume)	P zones ouvertes (16)	0,75 – 1,0 (4, 14)	L= D (14)	0 (4)		aucun traitement particulier (4, 14)	POST (4)	F	
Mentha spicata (Menthe verte)	P zones humides (16)	2,21 (4)		0 (4)		aucun traitement particulier (4)	POST (4)	F	
Nepeta cataria (Herbe à chats)	P zones perturbées (16)	0,54 (4, 14)	L= D (14)	0 (4)		aucun traitement particulier (2, 4, 14)	POST (2,4)	F	

▼M6

FAMILLE Nom botanique de l'espèce (Nom commun français)	Durée de vie [1] et habitat	Poids des graines (mg)	Photopériode pour la germination ou la croissance [2]	Profondeur du semis (mm) [3]	Durée de germination (jours) [4]	Traitements spéciaux [5]	Essai de toxicité [6]	Distributeurs de semences [7]	Autres références [8]
Prunella vulgaris (Brunelle commune)	P terres arables, zones herbeuses, sites perturbés (16, 19)	0,58 – 1,2. (4, 14, 19)	L= D (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19). 7 (91 %) (18).	germination inhibée par l'obscurité (18, 19) meilleure germination avec les grosses graines (1) aucun traitement particulier (4, 14, 22)	POST (4, 22)	A, F	
Stachys officinalis (Epiaire officinale)	P prairies, bordures de champs (19)	14-18 (14, 19)	L= D (14)		7 (50 %) (19)	aucun traitement particulier (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	
MALVACEAE *Abutilón theophrasti* (Abutilón)	A champs, habitats ouverts (16)	8,8 (14)	L= D (14)	10-20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	scarification (14) aucun traitement particulier (5, 10, 21)	PRE & POST (6, 22, 28, 31)	A, F	
Sida spinosa (Sida épineux)	A champs, bords de route (16)	3,8 (14)	L= D (14)	10-20 (6, 21)		scarification (14) germination non affectée par une irradiation (1) aucun traitement particulier (6,21)	PRE & POST (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE *Papaver rhoeas* (Grand coquelicot)	A champs, terres arables, sites perturbés (16, 19)	0,1 – 0,3 (4, 14, 19, 29)	L= D (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	stratification froide et scarification (1, 19, 32) aucun traitement particulier (4, 14, 29)	POST (4)	A, D, E, F, G	
POACEAE *Agrostis tenuis* (Agrostide vulgaire)	pelouses, pâturages (16)	0,07 (14)	L > D (IO)	20 (10)	10 (62 %) (10).	germination inhibée par l'obscurité (1, 17-19) aucun traitement particulier (10)	POST (10)	A, E	
Alopecurus myosuroides (Vulpin agreste)	A champs, habitats ouverts (16)	0,9-1,6 (29, 34)	L = D (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	scarification (14) traiter avec 101 mg/l de KNO3 (14) stratification chaude (1) germination inhibée par l'obscurité (1) aucun traitement particulier (34)	PRE & POST (28, 34)	A	32

▼M6

FAMILLE Nom botanique de l'espèce (Nom commun français)	Durée de vie [1] et habitat	Poids des graines (mg)	Photopériode pour la germination ou la croissance [2]	Profondeur du semis (mm) [3]	Durée de germination (jours) [4]	Traitements spéciaux [5]	Essai de toxicité [6]	Distributeurs de semences [7]	Autres références [8]
Avena fatua (Avoine folle)	A zones cultivées, habitats ouverts (16)	7 – 37,5 (14, 30)	L = D (14) L > D (6)	10 — 20 (6, 10)	3 (70 %) (18).	scarification (7, 32) germination inhibée par l'obscurité (1) stratification froide (1,18) aucun traitement particulier (6, 10, 14)	PRE & POST (6, 10, 28, 31)	A	
Bromus tectorum (Brome des toits)	A champs, bords de routes, terres arables (16)	0,45 – 2,28 (14, 29)	L = D (14)	3 (29)		période de maturation (1, 7, 32) germination inhibée par la lumière (1) aucun traitement particulier (14)	PRE & POST (28, 31)	A	
Cynosurus cristatus (Crételle)	P champs, bords de routes, habitats ouverts (16, 19)	0,5 – 0,7 (14, 19, 29).	L = D (14)	0 (29)	3 (50 %) (19).	germination non affectée par une irradiation (19) aucun traitement particulier (14, 29)	POST (5)	A	
Digitaria sanguinalis (Digitaire sanguine)	A champs, gazon, habitats ouverts (16)	0,52 – 0,6 (14,30)	L = D (14)	10 - 20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7).	scarification, stratification froide & maturation (1, 7, 14, 32) traiter avec 101 mg/l de KNO3 (14) germination inhibée par l'obscurité (1) aucun traitement particulier (21)	PRE & POST (18, 25, 31)	A	
Echinochloa crusgalli (panic pied-de-coq)	A (16)	1,5 (14)	L = D (14) L > D (3)	10 - 20 (7, 21)		scarification (7, 32) germination non affectée par une irradiation (1) aucun traitement particulier (3, 14, 21)	PRE & POST (3, 21, 28, 31)	A	
Elymus canadensis (Elyme du Canada)	P riverain, sites perturbés (16)	4-5 (14, 30)	L = D (11)	1 (11)	14-28 (11)	aucun traitement particulier (2, 11)	POST (2)	C, D, E	
Festuca pratensis (Fétuque des prés)	P champs, zones humides (16, 19)	1,53-2,2 (16, 19)	L = D (14) L > D (10)	20 (10)	9 (74 %) (10). 2 (50 %) (19).	aucun traitement particulier (10, 19)	POST (10)	A	7

▼M6

FAMILLE Nom botanique de l'espèce (Nom commun français)	Durée de vie [1] et habitat	Poids des graines (mg)	Photopériode pour la germination ou la croissance [2]	Profondeur du semis (mm) [3]	Durée de germination (jours) [4]	Traitements spéciaux [5]	Essai de toxicité [6]	Distributeurs de semences [7]	Autres références [8]
Hordeum pusillum (Orge naine)	A pâturages, bords de routes, habitats ouverts (16)	3,28 (14)				stratification chaude (1) germination non affectée par une irradiation (1)	PRE (31)		7
Phieum pratense (Fléole des prés)	P pâturages, terres arables, sites perturbés (16, 19)	0,45 (14, 19)	L > D (10, 14)	0-10 (10, 19)	2 (74 %) (10). 8 (50 %) (19).	germination inhibée par l'obscurité (19) germination non affectée par une irradiation (17) aucun traitement particulier (10, 14, 17, 19)	POST (10)	A, E	
POLYGONACEAE *Polygonum convolvulus* (Renouée faux-liseron)	A habitats ouverts, bords de routes (16)	5 – 8 (4, 14, 29)	L = D (20)	0-2 (4, 29)		stratification froide pendant 4-8 semaines (1, 2, 4, 20, 29) germination non affectée par une irradiation (1)	PRE & POST 1, 2, 20, 28, 31	A	32
Polygonum lapathifolium (Renouée à feuille de patience)	A sol humide (16)	1,8 – 2,5 (14)	L > D (6)		5 (94 %) (18).	germination non affectée par une irradiation (1) germination inhibée par l'obscurité (18) stratification froide (1) aucun traitement particulier (5)	PRE & POST (6)	A, E	
Polygonum pennsylvanicum (Renouée de Pennsylvanie)	A champs, habitats ouverts (16)	3,6 – 7 (14, 29)		2 (29)		stratification froide pendant 4 semaines à 0 - 5 °C (1, 29) germination inhibée par l'obscurité (1)	PRE (31)	A, E	
Polygonum periscaria (Renouée persicaire)	A zones perturbées, terres arables (16, 19)	2,1 – 2,3 (14, 19)	L > D (13)	0 (19)	14 (13) 2 (50 %) (19).	scarification, stratification froide, traitement au GA (14) stratification froide, maturation (17 - 19) germination inhibée par l'obscurité (19) aucun traitement particulier (13)	POST (13)	A	32

▼M6

FAMILLE Nom botanique de l'espèce (Nom commun français)	Durée de vie ([1]) et habitat	Poids des graines (mg)	Photopériode pour la germination ou la croissance ([2])	Profondeur du semis (mm) ([3])	Durée de germination (jours) ([4])	Traitements spéciaux ([5])	Essai de toxicité ([6])	Distributeurs de semences ([7])	Autres références ([8])
Rumex crispus (Patience crépue)	P terres arables, bords de routes, zones ouvertes (16, 19)	1,3 – 1,5 (4, 14, 19)	L = D (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19). 6 (100 %) (33).	germination inhibée par une irradiation (18, 19) une maturation peut être requise (18) aucun traitement particulier (4, 14, 33)	POST (4, 33)	A, E	32
PRIMULACEAE *Anagallis arvensis* (Mourron rouge)	A terres arables, zones ouvertes, sites perturbés (16, 19)	0,4 – 0,5 (4, 14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19).	stratification froide, traitement au G A (1, 14, 18, 19, 32) lumière requise pour la germination (1) aucun traitement particulier (2, 4)	POST (2,4)	A, F	
RANUNCULACEAE *Ranunculus acris* (Renoncule acre)	P terres arables, bords de routes, zones ouvertes (16, 19)	1,5 – 2 (14, 19, 29)	L = D (14)	1 (29)	41 - 56 (19, 29)	aucun traitement particulier (5, 14, 22, 24 - 26)	POST (5, 22, 24-26)		32
ROSACEAE *Geum urbanum* (Benoîte commune)	P bordures de haies, zones humides (16, 19)	0,8 – 1,5 (14, 19).	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19). 16 (79 %) (18).	germination inhibée par l'obscurité (18, 19) stratification à chaude (1) aucun traitement particulier (5, 14, 22, 25, 26)	POST (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE *Galium aparine* (Gailiet gratteron)	A terres arables, zones humides, sites perturbés (16, 19)	7-9 (14, 19)	L = D (14)		5 (50 %) (19). 6 (100 %) (18).	stratification froide (1, 18, 19) germination non affectée par une irradiation (18, 19) la lumière inhibe la germination (1) aucun traitement particulier (6, 14)	PRE & POST (6, 28)	A	32

▼M6

FAMILLE Nom botanique de l'espèce (Nom commun français)	Durée de vie (1) et habitat	Poids des graines (mg)	Photopériode pour la germination ou la croissance (2)	Profondeur du semis (mm) (3)	Durée de germination (jours) (4)	Traitements spéciaux (5)	Essai de toxicité (6)	Distributeurs de semences (7)	Autres références (8)
Galium mollugo (Caille-lait blanc)	P haies sur talus, zones ouvertes (8)	7 (29)	L = D (14)	2 (29)		aucun traitement particulier (5, 14, 22, 24, 26, 29)	POST (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE *Digitalis purpurea* (Digitale pourpre)	B, P haies, zones ouvertes (16, 19)	0,1 – 0,6 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19). 8 (99 %) (18).	germination inhibée par l'obscurité (1,17-19) aucun traitement particulier (4, 22-26)	POST (4, 22 - 26)	D, G, F	
Veronica persica (Véronique de Perse)	A terres arables, zones ouvertes, sites perturbés (16, 19)	0,5-0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3(19) 5 (96 %) (18).	germination inhibée par l'obscurité (18, 19) stratification froide (18) aucun traitement particulier (14)	PRE & POST (28)	A	32

(1) A = annuelles, B = bisannuelles, P = pérennes
(2) Les références 11, 14 et 33 concernent la proportion de lumière (L) et d'obscurité (D) requise pour induire la germination des graines. Les références 3, 6, 9, 10, 13, 20 concernent les conditions de croissance en serre.
(3) 0 mm indique que les graines sont semées sur la surface du sol ou que les graines ont besoin de lumière pour germer.
(4) Les nombres indiqués correspondent au nombre de jours pendant lesquels germe un certain pourcentage de graines selon la référence indiquée, par exemple, germination 3 jours (50 %) (référence 19).
(5) La durée de maturation et/ou les données sur la stratification ne sont pas toujours disponibles. Sauf dans les cas où un traitement à froid est nécessaire, les conditions de température ne sont pas spécifiées, cardans les essais en serre, le contrôle de la température est limité. La plupart des graines germent dans des conditions de fluctuations de températures normales observées en serre.
(6) indique qu'une espèce a été utilisée dans un essai de toxicité sur plantes pré-émergence (PRE) et/ou post-émergence (POST) impliquant des herbicides.
(7) Donne des exemples de distributeurs de semences du commerce.
(8) Fournit d'autres références qui ont été consultées

▼M6

Distributeurs de semences cités

ID Fournisseur	Coordonnées Fournisseur
A	Herbiseed New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ ENGLAND +44 (0) 1189 349 464 www.herbiseed.com
B	Tropilab Inc. 8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771-3948 USA (727) 344 - 4050 www.tropilab.com
C	Pterophylla — Native Plants & Seeds #316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON N0E 1X0 CANADA (519) 586 - 3985
D	Applewood Seed Co. 5380 Vivian St., Arvada, CO 80002 USA (303) 431 - 7333 www.applewoodseed.com
E	Ernst Conservation Seeds 9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335 USA (800) 873 - 3321 www.ernstseed.com
F	Chiltern Seeds Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB ENGLAND +44 1229 581137 www.chiltemseeds.co.uk
G	Thompson & Morgan P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7 CANADA (800) 274 - 7333 www.thompson-morgan.com

RÉFÉRENCES CITÉES

(1) Baskin, C.C. & Baskin, J.M. 1998. Seeds. Academic Press, Toronto

(2) Blackburn, L.G. & Boutin, C. 2003. Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Round-Up®). Ecotoxicology, 12:271-285.

(3) Boutin, C., Lee, H-B., Peart, T., Batchelor, P.S., & Maguire, R.J. 2000. Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Environmental Toxicology & Chemistry, 19(10):2532-2541.

(4) Boutin, C., Elmegaard, N., & Kjaer, C. 2004. Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: implications for risk assessment. Ecotoxicology, 13:349-369.

(5) Breeze, V., Thomas, G., & Butler, R. 1992. Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides. Annals of Applied Biology, 121:669-677.

(6) Brown, R.A., & Farmer, D. 1991. Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. In: Plants for toxicity assessment: 2nd volume. ASTM STP 1115, J.W. Gorsuch, W.R. Lower, W.Wang, & M.A. Lewis, eds. American Society for Testing & Materials, Philadelphia. pp 197 — 208.

▼M6

(7) Buhler, D.D. & Hoffman, M.L. 1999. Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants. Weed Science Society of America, Lawrence, K.

(8) Clapham, A.R., Tutin, T.G., & Warburg, E.F. 1981. Excursion flora of the British Isles, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge

(9) Clay, P.A. & Griffin, J.L. 2000. Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. Weed Science, 48:481-486.

(10) Cole, J.F.H. & Canning, L. 1993. Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants. BCPC — Weeds. pp. 151 — 156.

(11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Personal communication. (www.ernstseed.com)

(12) Fletcher, J.S., Johnson, F.L., & McFarlane, J.C. 1990. Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. Environmental Toxicology & Chemistry, 9:769-776.

(13) Fletcher, J.S., Pfleeger, T.G., Ratsch, H.C., & Hayes, R. 1996. Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. Environmental Toxicology & Chemistry, 15(7):1189-1196.

(14) Flynn, S., Turner, R.M., and Dickie, J.B. 2004. Seed Information Database (release 6.0, Oct 2004) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgkew.org.uk/data/sid)

(15) Franzaring, J., Kempenaar, C., & van der Eerden, L.J.M. 2001. Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. Environmental Pollution, 114:21-28.

(16) Gleason, H.A. & Cronquist, A. 1991. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, 2nd ed. New York Botanical Garden, Bronx, NY

(17) Grime, J.P. 1981. The role of seed dormancy in vegetation dynamics. Annals of Applied Biology, 98:555-558.

(18) Grime, J.P., Mason, G., Curtis, A.V., Rodman, J., Band, S.R., Mowforth, M.A.G., Neal, A.M., & Shaw, S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. Journal of Ecology, 69:1017-1059.

(19) Grime, J.P., Hodgson, J.G., & Hunt, R. 1988. Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman Ltd., London

(20) Kjaer, C. 1994. Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (Polygonum convolvulus L.). Weed Research, 34:453-459.

(21) Klingaman, T.E., King, C.A., & Oliver, L.R. 1992. Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. Weed Science, 40:227-232.

(22) Marrs, R.H., Williams, C.T., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1989. Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. Environmental Pollution, 59:71-86.

(23) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure. Environmental Pollution, 69:223-235.

(24) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. Environmental Pollution, 73:25-42.

(25) Marrs, R.H., Frost, A.J., Plant, R.A., & Lunnis, P. 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. Agriculture, Ecosystems, & Environment, 45:283-293.

▼**M6**

(26) Marrs, R.H. & Frost, A.J. 1997. A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. Journal of Environmental Management, 50:369-388.

(27) Marshall, E.J.P. & Bernie, J.E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. BCPC — Weeds. pp. 1021-1028.

(28) McKelvey, R.A., Wright, J.P., & Honegger, J.L. 2002. A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. Pest Management Science, 58:1161-1174.

(29) Morton, S. (Herbiseed). 2004. Personal communication. (http://www.herbiseed.com)

(30) USDA, NRCS. 2004. The Plants Database, version 3.5. (http://plants.usda.gov). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA

(31) USEPA. 1999. One-Liner Database. [U.S. E.P.A./Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].

(32) Webster, R.H. 1979. Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.

(33) White, A. L. & Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Personal communication.

(34) Zwerger, P. & Pestemer, W. 2000. Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh., 17:711-718.

▼**M6**

Appendice 4

Exemple de conditions de croissance appropriées à certaines espèces cultivées

Les conditions suivantes se sont révélées satisfaisantes pour 10 espèces cultivées et on peut donc s'en inspirer pour les essais en chambre de culture avec certaines autres espèces:

Concentration de dioxyde de carbone: 350 ± 50 ppm;

Humidité relative: 70 ± 5 % pendant les périodes d'éclairement et 90 ± 5 % pendant les périodes d'obscurité;

Température: 25 ± 3 °C pendant la journée, 20 ± 3 °C pendant la nuit;

Photopériode: 16 heures de lumière/8 heures d'obscurité, en supposant une longueur d'onde moyenne de 400 à 700 nm;

Lumière: luminance de 350 ± 50 $\mu E/m^2/s$, mesurée au-dessus du feuillage.

Les espèces végétales sont les suivantes:

— tomate (*Solanum lycopersicon*),

— concombre (*Cucumis sativus*),

— laitue (*Lactuca sativa*),

— soja (*Glycine max*),

— chou (*Brassica oleracea* var. *capitata*),

— carotte (*Daucus carota*),

— avoine (*Avena sativa*),

— raygras pérenne (*Lolium perenne*),

— maïs (*Zea mays*),

— oignon (*Allium cepa*).

▼M6

C.32. ESSAI DE REPRODUCTION CHEZ L'ENCHYTRÉE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 220 (2004) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Elle est destinée à évaluer les effets des substances chimiques sur la reproduction d'un ver enchytrée, *Enchytraeus albidus*, Henle 1873, dans le sol. Elle repose pour l'essentiel sur une méthode développée par l'Umweltbundesamt (Allemagne) (1) qui a été soumise à un essai tournant (2). D'autres méthodes d'évaluation de la toxicité des substances chimiques sur les enchytrées et les lombrics ont aussi été prises en considération (3)(4)(5)(6)(7)(8).

CONSIDÉRATIONS INITIALES

2. Les annélides pédocoles du genre Enchytraeus sont des espèces écologiquement pertinentes pour les essais d'écotoxicité. Bien que fréquents dans les sols à lombrics, les enchytrées colonisent souvent en abondance de nombreux sols qui n'abritent pas de lombrics. Les enchytrées se prêtent à des essais en laboratoire, ainsi qu'à des essais sur le terrain et en partie sur le terrain. Sur le plan pratique, de nombreuses espèces d' Enchytraeus sont faciles à manipuler et à élever et leur génération est nettement plus courte que celle des lombrics. Aussi la durée d'un essai de reproduction chez l'enchytrée n'est-elle que de 4 à 6 semaines, contre 8 semaines chez les lombrics (Eisenia fetida).

3. Des notions de base sur l'écologie et l'écotoxicologie des enchytrées en milieu terrestre sont fournies par les références (9)(10)(11)(12).

PRINCIPE DE L'ESSAI

4. Les enchytrées adultes sont exposés à une gamme de concentrations de la substance chimique d'essai mélangée à un sol artificiel. Cet essai peut être divisé en deux étapes: a) un essai de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations, si des informations manquent, où la mortalité constitue le principal résultat évalué après deux semaines d'exposition et b) l'essai de reproduction proprement dit dans lequel on évalue le nombre total de vers juvéniles produits par animal parent et la survie des animaux parents. L'essai proprement dit dure six semaines. À la fin des trois premières semaines, on enlève les vers adultes et on note leurs changements morphologiques. Au terme des trois semaines suivantes, le nombre de descendants éclos des cocons engendrés par les adultes est compté. On compare le taux de reproduction des animaux exposés à la substance chimique d'essai à celui du(des) témoin(s), afin de déterminer i) la concentration sans effet observé (CSEO) et/ou ii) la CE_x (par exemple CE_{10}, CE_{50}), à l'aide d'un modèle de régression pour estimer la concentration qui entraînerait une réduction de x % du taux de reproduction. Les concentrations expérimentales doivent couvrir la CE_x (par exemple CE_{10}, CE_{50}), de façon à ce que la CE_x soit interpolée plutôt qu'extrapolée.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE CHIMIQUE D'ESSAI

5. Il est préférable de connaître l'hydrosolubilité, le log K_{oe}, le coefficient de partage entre l'eau et le sol (chapitre C.18 ou C.19 de la présente annexe, par exemple) et la pression de vapeur de la substance chimique d'essai. Des informations supplémentaires sur le devenir de la substance chimique d'essai dans le sol, notamment sa vitesse de photolyse et d'hydrolyse, seraient souhaitables.

6. La présente méthode d'essai convient à l'essai de substances chimiques hydrosolubles ou insolubles; néanmoins, le mode d'application de la substance d'essai variera en conséquence. Cette méthode d'essai ne s'applique pas aux substances volatiles, à savoir les substances dont la constante de Henry ou le coefficient de partage air/eau sont supérieurs à un, ou les substances dont la pression de vapeur dépasse 0,0133 Pa à 25 °C.

▼M6

VALIDITÉ DE L'ESSAI

7. Pour que l'essai soit valide, les témoins doivent satisfaire aux critères suivants:

— la mortalité des adultes n'excédera pas 20 % à la fin de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations et à la fin des trois premières semaines de l'essai de reproduction.

— si dix adultes ont été déposés dans chaque récipient au début de l'essai, on doit retrouver en moyenne au moins 25 vers juvéniles par récipient à la fin de l'essai.

— le coefficient de variation autour du nombre moyen de vers juvéniles ne doit pas dépasser 50 % à la fin de l'essai de reproduction.

Un essai qui ne remplirait pas les critères de validité susmentionnés doit être arrêté, à moins que la poursuite de l'essai puisse être justifiée. Cette justification doit figurer dans le rapport d'essai.

SUBSTANCE CHIMIQUE DE RÉFÉRENCE

8. Afin de vérifier que la réaction des organismes d'expérience ne change pas de façon significative au cours du temps, une substance chimique de référence sera soit testée à intervalles réguliers, soit incluse dans chaque essai. La carbendazime, qui affecte la survie et la reproduction des enchytrées (13)(14), est une substance de référence appropriée, tout comme d'autres produits chimiques dont la toxicité est bien connue. Le Derosal™, fourni par AgrEvo (Francfort, Allemagne), est un produit renfermant de la carbendazime à raison de 360 g/l (32,18 %) d'ingrédient actif, qui a été utilisé dans un essai tournant (2). La CE_{50} pour la reproduction déterminée au cours de l'essai tournant s'élevait à 1,2 ± 0,8 mg d'ingrédient actif/kg de masse sèche (2). Si un étalon toxique positif est inclus dans la série d'essais, on n'applique qu'une seule concentration et un nombre d'expériences identiques égal à celui des témoins. En ce qui concerne la carbendazime, on recommande l'essai de 1,2 mg d'ingrédient actif/kg de poids sec (testé sous forme liquide).

DESCRIPTION DE L'ESSAI

Matériel

9. Les récipients expérimentaux doivent être composés de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte. On utilisera des bocaux en verre (volume: 0,20 - 0,25 litre; diamètre ± 6 cm, par exemple) munis de couvercles transparents (en verre ou en polyéthylène, par exemple) afin de réduire l'évaporation de l'eau, tout en autorisant les échanges gazeux entre le sol et l'atmosphère. Les couvercles doivent être transparents pour laisser passer la lumière.

10. Cet essai requiert du matériel de laboratoire courant et en particulier:

— armoire à séchage;

— stéréomicroscope;

— pH-mètre et photomètre

— balances suffisamment précises;

— instruments appropriés permettant de réguler la température;

— instruments appropriés permettant de réguler l'humidité (pas essentiel si les récipients expérimentaux ont des couvercles);

— incubateur ou petite chambre équipée d'un conditionnement de l'air;

— pinces, crochets ou anses;

— cuve de développement photographique

Préparation du sol artificiel

11. Dans cet essai, on utilise un sol artificiel (5)(7) composé comme suit (en poids secs, séchés à 105 °C jusqu'à obtention d'un poids constant):

▼**M6**

— 10 % de tourbe à sphaigne, séchée à l'air et finement broyée (une dimension des particules de 2±1 mm est acceptable); il est recommandé de vérifier qu'un sol préparé avec un lot frais de tourbe convient à la culture des vers, avant de l'utiliser dans un essai;

— 20 % d'argile kaolinique (taux de kaolinite de préférence supérieur à 30 %);

— environ 0,3 à 1,0 % de carbonate de calcium ($CaCO_3$ pulvérisé, de qualité pour analyse) pour obtenir un pH de 6,0 ± 0,5; la quantité de carbonate de calcium à ajouter peut dépendre principalement de la qualité/nature de la tourbe;

— environ 70 % de sable quartzique (selon la quantité de $CaCO_3$ nécessaire) séché à l'air, composé en majorité de sable fin (plus de 50 % des particules mesurant entre 50 et 200 μm).

Avant d'utiliser le sol artificiel dans l'essai proprement dit, il est conseillé de démontrer que ce sol convient à la culture des vers et qu'il permet de répondre aux critères de validité de l'essai. Cette précaution vise en particulier à vérifier que le bon fonctionnement de l'essai ne sera pas compromis si la teneur en carbone organique du sol artificiel est réduite, par exemple si le pourcentage de tourbe est ramené à 4-5 % et que le taux de sable est augmenté en conséquence. Cette réduction de la teneur en carbone organique est susceptible de diminuer les possibilités d'adsorption de la substance chimique d'essai sur le sol (carbone organique) et d'augmenter la disponibilité de la substance d'essai pour les vers. Il a été démontré qu'*Enchytraeus albidus* peut satisfaire aux critères de validité concernant la reproduction lorsqu'il est testé sur le terrain sur des sols dont la teneur en carbone organique est inférieure à celle mentionnée ci-dessus (2,7 %, par exemple) (15), et on a constaté (bien que l'expérience en la matière soit limitée) que ce ver peut aussi satisfaire aux critères de validité lorsqu'il est mis à l'essai sur un sol artificiel renfermant 5 % de tourbe.

Remarque: Lorsqu'on utilise un sol naturel dans un essai supplémentaire (réalisé à un niveau supérieur dans le cadre d'essais séquentiels, par exemple), l'adéquation du sol à la culture des vers et au respect des critères de validité doit aussi être démontrée.

12. Les ingrédients secs du sol sont mélangés complètement (par exemple, dans un grand mélangeur de laboratoire), et ce au moins une semaine avant le début de l'essai. Le sol mélangé doit être entreposé durant deux jours pour que l'acidité s'équilibre/se stabilise. Pour déterminer le pH, on mélange le sol avec une solution 1 M de chlorure de potassium (KCl) ou 0,01 M de chlorure de calcium ($CaCl_2$) dans des proportions de 1/5 [voir (16) et Appendice 3]. Si l'acidité du sol dépasse les valeurs incluses dans la gamme requise (voir paragraphe 11), elle peut être ajustée par l'addition d'une quantité appropriée de $CaCO_3$. Si le sol est trop alcalin, il peut être rééquilibré par l'ajout d'un mélange comprenant les ingrédients cités au paragraphe 11, à l'exclusion du $CaCO_3$.

13. La capacité maximale de rétention d'eau du sol artificiel est déterminée conformément aux procédures décrites à l'Appendice 2. Un ou deux jours avant le début de l'essai, le sol artificiel sec est préhumidifié par l'ajout d'une quantité suffisante d'eau désionisée pour atteindre environ la moitié de sa teneur en eau finale, à savoir 40 à 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau. Au début de l'essai, le sol préhumidifié est divisé en autant de portions que de concentrations expérimentales, témoins et substance chimique de référence utilisés dans l'essai. La teneur en humidité est

▼M6

ajustée à 40-60 % de la capacité maximale de rétention d'eau par l'addition de la solution contenant la substance d'essai et/ou d'eau distillée ou désionisée (voir paragraphes 19-21). La teneur en humidité est déterminée au début et à la fin de l'essai (par séchage à 105 °C jusqu'à obtention d'un poids constant) et doit se situer dans la gamme optimale pour la survie des vers. Il est possible d'estimer en gros le taux d'humidité du sol en pressant doucement une poignée de sol dans une main: si le taux d'humidité est correct, de petites gouttes d'eau apparaissent entre les doigts.

Sélection et préparation des animaux d'essai

14. L'espèce recommandée dans cet essai est *Enchytraeus albidus*, Henle 1837 (ver blanc), de la famille des *Enchytraeidae* (ordre des *Oligochaeta*, phylum des *annélides*). *E. albidus* est l'un des plus grands représentants des enchytrées, des spécimens mesurant jusqu'à 35 mm de long ayant été recensés (17)(18). Espèce à répartition mondiale, *E. albidus* colonise des habitats marins, dulcicoles et terrestres, constitués la plupart du temps de matière organique en décomposition (algues, compost), et fréquente rarement les prairies (9). Le fait qu'il tolère une gamme étendue de conditions écologiques et certaines variations morphologiques indiquent qu'il pourrait exister différentes races.

15. *E. albidus* est vendu dans le commerce, comme nourriture pour les poissons. Il y a lieu de vérifier si la culture est contaminée par d'autres espèces, généralement plus petites (1)(19). Dans l'affirmative, tous les vers doivent être lavés à l'eau dans une boîte de Petri. On sélectionne ensuite les grands spécimens adultes d'*E. albidus* (au moyen d'un stéréomicroscope), afin de lancer une nouvelle culture et on jette tous les autres vers. *E. albidus* s'élève facilement sur des matières organiques très diverses (voir Appendice 4). Le cycle de vie d'E. albidus est court: il met entre 33 jours (à 18 °C) et 74 jours (à 12 °C) à atteindre sa maturité (1). Seules les cultures qui auront pu être maintenues en laboratoire durant au moins cinq semaines (1 génération) sans poser de problème seront utilisées dans l'essai.

16. D'autres espèces du genre *Enchytraeus* conviennent également, par exemple *E. buchholzi*, Vejdovsky 1879, ou *E. crypticus* Westheide & Graefe 1992 (voir Appendice 5). Si on utilise d'autres espèces d' *Enchytraeus*, il faut les identifier clairement et justifier ce choix dans le rapport.

17. Les animaux utilisés dans les essais sont des vers adultes. Il doivent porter des oeufs (points blancs) dans la région du clitellum et mesurer à peu près la même taille (environ 1 cm de long). La synchronisation de la culture d'élevage n'est pas nécessaire.

18. Si les enchytrées ne sont pas élevés sur un type de sol et dans des conditions (y compris alimentaires) identiques à celles de l'essai final, ils doivent passer par une période d'acclimatation comprise entre 24 heures et 3 jours. Il convient d'acclimater au départ un plus grand nombre d'adultes que ne le requiert l'essai, afin de pouvoir rejeter les individus blessés ou inutilisables pour une autre raison. Au terme de la période d'acclimatation, seuls les vers portant des oeufs et ne manifestant aucun comportement anormal (par exemple, essayant d'échapper du sol) sont sélectionnés pour l'essai. Les vers sont prélevés soigneusement à l'aide d'une pince de bijoutier, de crochets ou d'anses et placés dans une boîte de Petri contenant une petite quantité d'eau douce. À cet effet, il est préférable d'utiliser une eau douce reconstituée, telle que décrite au chapitre C.20 de la présente annexe (*Daphnia magna*, Essai de reproduction, l'eau désionisée, déminéralisée ou du robinet risquant d'être néfaste aux vers. Les vers sont examinés au stéréomicroscope et tous ceux qui ne portent pas d'oeufs sont éliminés. On veillera à éliminer toutes les mites ou les collemboles qui auraient pu infecter les cultures. Les vers sains qui ne serviront pas à l'essai sont remis dans la culture mère.

▼M6

Préparation des concentrations expérimentales

Substance chimique d'essai hydrosoluble

19. Une solution de la substance chimique d'essai dans de l'eau désionisée est préparée en quantité suffisante pour toutes les expériences identiques d'une concentration expérimentale. Il est recommandé d'utiliser la quantité d'eau nécessaire pour obtenir le taux d'humidité requis, à savoir 40 à 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau (voir paragraphe 13). Chaque solution de la substance d'essai est mélangée complètement avec un lot du sol préhumidifié, avant d'être introduite dans le récipient expérimental.

Substance chimique d'essai non soluble dans l'eau

20. Les substances chimiques non solubles dans l'eau mais solubles dans des solvants organiques peuvent être dissoutes dans le plus petit volume possible d'un véhicule approprié (par exemple de l'acétone). Seuls des solvants volatils peuvent être utilisés. Le véhicule est pulvérisé sur, ou mélangé à, une petite quantité, 2,5 g par exemple, de sable quartzique fin. Ensuite, le véhicule est éliminé par évaporation sous une hotte durant au moins une heure. Ce mélange de sable quartzique et de la substance chimique d'essai est ajouté au sol préhumidifié, auquel il sera mélangé complètement après l'ajout de la quantité nécessaire d'eau désionisée pour atteindre l'humidité requise. Le mélange final est introduit dans les récipients expérimentaux.

21. Pour les substances chimiques peu solubles dans l'eau et les solvants organiques, on mélange l'équivalent de 2,5 g de sable quartzique finement broyé par récipient expérimental à la quantité nécessaire de la substance chimique d'essai pour obtenir la concentration expérimentale voulue. Ce mélange de sable quartzique et de la substance chimique d'essai est ajouté au sol préhumidifié, auquel il sera mélangé complètement après l'ajout de la quantité nécessaire d'eau désionisée pour atteindre l'humidité requise. Le mélange final est réparti entre les récipients expérimentaux. On répète la procédure pour chaque concentration expérimentale et on prépare un témoin approprié.

22. En principe, les substances ne devraient pas être mises à l'essai à des concentrations supérieures à 1 000 mg/kg de masse sèche de sol. Cependant, certains objectifs expérimentaux particuliers pourront exiger des concentrations supérieures.

CONDUITE DES ESSAIS

Groupes traités et témoins

23. Pour chaque concentration expérimentale, une quantité de sol d'essai correspondant à 20 g de poids sec est placée dans le récipient expérimental (voir paragraphes 19-21). On prépare également des récipients témoins sans substance chimique d'essai. La nourriture est introduite dans chaque récipient selon les procédures décrites au paragraphe 29. Dix vers choisis au hasard sont assignés à chaque récipient expérimental. Les vers sont soigneusement transférés dans les récipients et déposés à la surface du sol à l'aide de pinces, de crochets ou d'anses, par exemple. Le nombre d'expériences identiques pour les concentrations expérimentales et les témoins dépend de la conception de l'essai (voir paragraphe 34). Les récipients expérimentaux sont placés au hasard dans l'incubateur et leurs emplacements sont modifiés au hasard chaque semaine.

24. Si la substance chimique d'essai est appliquée à l'aide d'un véhicule, une série de témoins contenant du sable quartzique sur lequel le solvant a été pulvérisé ou auquel le solvant a été mélangé devrait être mise à l'essai parallèlement à la série traitée avec la substance chimique d'essai. La concentration du solvant ou du dispersant devrait être identique à celle utilisée dans les récipients expérimentaux contenant la substance d'essai. Une série de témoins contenant un supplément de sable quartzique (2,5 g par récipient) devrait aussi être mise à l'essai pour les substances administrées conformément à la procédure décrite au paragraphe 21.

▼M6

Conditions expérimentales

25. La température expérimentale est de 20 ± 2 °C. Pour dissuader les vers de s'échapper du sol, l'essai est mené sous des cycles réglés de lumière et d'obscurité (de préférence 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité), avec un éclairement de 400 à 800 lux dans la zone des récipients expérimentaux.

26. Pour vérifier l'humidité du sol, on pèse les récipients au début de l'essai, puis une fois par semaine. La perte de poids est compensée par l'ajout d'une quantité équivalente d'eau désionisée. Remarquons que la perte d'eau peut être réduite par le maintien d'un taux d'humidité de l'air élevé (> 80 %) dans l'incubateur.

27. Le taux d'humidité et le pH sont à mesurer au début et à la fin de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations et de l'essai proprement dit. Les mesures doivent être effectuées sur des échantillons de sol traités (à toutes les concentrations) et témoins, préparés et entretenus de la même manière que les cultures expérimentales, mais ne contenant pas de vers. La nourriture ne sera ajoutée à ces échantillons de sol qu'au début de l'essai, afin de faciliter l'activité microbienne, et ce dans des quantités identiques à celles administrées aux cultures expérimentales. Il n'est pas nécessaire d'ajouter plus de nourriture dans ces récipients au cours de l'essai.

Alimentation

28. On utilisera une nourriture à même de satisfaire aux besoins de la population d'enchytrées. Les flocons d'avoine, de préférence autoclavés avant l'emploi pour éviter une contamination microbienne (un traitement à la chaleur convient également) constituent une nourriture appropriée.

29. La première fois, on administre la nourriture en mélangeant 50 mg de flocons d'avoine moulus au sol de chaque récipient, avant d'y introduire les vers. Par la suite, la nourriture est dispensée une fois par semaine jusqu'au 21ème jour. Aucune nourriture n'est fournie le 28ème jour, car à cette date les adultes auront été enlevés et les vers juvéniles ne demandent désormais qu'un supplément relativement minime de nourriture. Au cours de l'essai, on introduit 25 mg de flocons d'avoine moulus dans chaque récipient, en les déposant soigneusement à la surface du sol de façon à éviter de blesser les vers. Pour réduire la croissance fongique, on enfouit les flocons d'avoine dans le sol en les recouvrant de petites quantités de sol. Si des restes de nourriture subsistent, on diminue la ration.

Conception de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations

30. Si nécessaire, un essai de détermination de l'ordre de grandeur sera mené avec, par exemple, cinq concentrations expérimentales: 0,1, 1,0, 10, 100 et 1 000 mg/kg (masse sèche de sol). Une expérience par concentration et par témoin suffit.

31. L'essai de détermination de l'ordre de grandeur dure deux semaines. À la fin de l'essai, on évalue la mortalité des vers. Un ver est consigné comme mort s'il ne réagit pas à un stimulus mécanique appliqué à l'extrémité antérieure. Outre le taux de mortalité, il pourrait être utile de disposer d'autres informations pour sélectionner la gamme de concentrations à appliquer dans l'essai proprement dit. Des modifications du comportement des adultes (par exemple, s'ils deviennent incapables de creuser le sol, s'ils restent prostrés contre la paroi en verre du récipient) et de leur morphologie (par exemple, des blessures ouvertes) devraient, par conséquent, aussi être notées, de même que la présence de vers juvéniles. Cette dernière peut être déterminée par la méthode de coloration décrite à l'Appendice 6.

32. La moyenne géométrique des données de la mortalité donne une idée approximative de la CL_{50}. On établit la gamme de concentrations pour l'essai proprement dit, en supposant que les effets sur la reproduction sont inférieurs à ceux de la CL_{50} d'un facteur pouvant aller jusqu'à 10. Il ne s'agit toutefois que d'une relation empirique, susceptible de ne pas se vérifier dans

▼M6

des cas particuliers. Les observations supplémentaires effectuées au cours de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur, telles que la présence de vers juvéniles, peuvent permettre d'ajuster plus finement la gamme de concentrations expérimentales à appliquer dans l'essai proprement dit.

33. Pour déterminer la CL_{50} avec précision, on recommande de conduire l'essai en y incluant au moins quatre expériences identiques par concentration expérimentale et un nombre suffisant de concentrations pour obtenir au moins quatre résultats moyens différents et statistiquement significatifs à ces concentrations. Le cas échéant, un nombre identique de concentrations et d'expériences identiques sera mis à l'essai pour les témoins.

Conception de l'essai de reproduction proprement dit

34. Trois conceptions, s'appuyant sur les recommandations émises à l'issue d'un essai tournant sont proposées (2):

— Pour déterminer la CSEO, tester au moins cinq concentrations formant une série géométrique. Il est recommandé d'inclure quatre expériences identiques par concentration expérimentale et huit témoins. Les concentrations sont espacées d'un facteur n'excédant pas 1,8.

— Pour déterminer la CE_x (CE_{10}, CE_{50}, par exemple), tester au moins cinq concentrations couvrant la CE_x, de façon à interpoler la CE_x au lieu de l'extrapoler. Il est recommandé d'inclure au moins quatre expériences identiques par concentration expérimentale et quatre témoins identiques. Le facteur d'espacement peut varier: il est inférieur ou égal à 1,8 dans la gamme censée produire un effet et supérieur à 1,8 aux concentrations supérieures et inférieures.

— Une approche combinée permet de déterminer à la fois la CSEO et la CE_x. Pour ce faire, on utilise huit concentrations formant une série géométrique. Il est recommandé d'inclure quatre expériences identiques par concentration et huit témoins. Les concentrations sont espacées d'un facteur n'excédant pas 1,8.

35. Chaque récipient expérimental contient dix vers adultes (voir paragraphe 23). La nourriture est déposée dans les récipients expérimentaux au début de l'essai, puis une fois par semaine (voir paragraphe 29) jusqu'au $21^{ème}$ jour inclus. Le $21^{ème}$ jour, on prélève soigneusement à la main les échantillons de sol, afin d'observer et de compter les vers adultes vivants et de recenser leurs éventuels changements de comportement (incapacité de creuser le sol, prostration contre la paroi en verre du récipient expérimental, par exemple) et de morphologie (blessures ouvertes, par exemple). Tous les vers adultes sont ensuite retirés des récipients expérimentaux et du sol d'essai. Le sol d'essai renfermant des cocons est incubé durant trois semaines supplémentaires dans les mêmes conditions expérimentales, à ceci près que la nourriture n'est administrée que le $35^{ème}$ jour (25 mg de flocons d'avoine moulus par récipient).

36. Après six semaines, les vers éclos sont comptés. On recommande d'appliquer la méthode de coloration au rouge de Bengale (voir Appendice 6), bien que d'autres techniques d'extraction et de flottation par voie humide (mais sans chauffage) (voir Appendice 6) aient également fait leurs preuves (4)(10)(11)(20). La coloration au rouge de Bengale est recommandée car l'extraction par voie humide à partir d'un sol peut être gênée par la turbidité causée par les particules d'argile en suspension.

Essai limite

37. Si la concentration la plus élevée (1 000 mg/kg) de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur n'engendre aucun effet, l'essai de reproduction peut être conduit comme un essai limite, à la dose de 1 000 mg/kg pour démontrer que la CSEO sur la reproduction est supérieure à cette valeur.

▼M6

Résumé et calendrier de l'essai

38. Les étapes de l'essai peuvent se résumer comme suit:

Calendrier	Essai de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations	Essai proprement dit
Jour –7 ou précédents	— Préparer le sol artificiel (mélanger les ingrédients secs)	— Préparer le sol artificiel (mélanger les ingrédients secs)
Jour –5	— Vérifier le pH du sol artificiel — Mesurer la capacité de rétention d'eau maximale du sol	— Vérifier le pH du sol artificiel — Mesurer la capacité de rétention d'eau maximale du sol
Jour –5 à –3	— Trier les vers en vue de leur acclimatation	— Trier les vers en vue de leur acclimatation
Jour -3 à 0	— Acclimater les vers durant au moins 24 heures	— Acclimater les vers durant au moins 24 heures
Jour –1	— Préhumidifier le sol artificiel et le diviser en lots	— Préhumidifier le sol artificiel et le diviser en lots
Jour 0	— Préparer les solutions mères — Appliquer la substance chimique d'essai — Peser le substrat expérimental dans les récipients expérimentaux — Y incorporer à la nourriture — Introduire les vers — Mesurer le pH et le taux d'humidité du sol	— Préparer les solutions mères — Appliquer la substance chimique d'essai — Peser le substrat expérimental dans les récipients expérimentaux — Y incorporer la nourriture — Introduire les vers — Mesurer le pH et le taux d'humidité du sol
Jour 7	— Vérifier le taux d'humidité du sol	— Vérifier le taux d'humidité du sol — Administrer la nourriture
Jour 14	— Déterminer la mortalité adulte — Estimer le nombre de vers juvéniles — Mesurer le pH et le taux d'humidité du sol	— Vérifier le taux d'humidité du sol — Administrer la nourriture
Jour 21		— Observer le comportement des adultes — Retirer les adultes — Déterminer la mortalité adulte — Vérifier le taux d'humidité du sol — Administrer la nourriture
Jour 28		— Vérifier le taux d'humidité du sol — Ne pas administrer de nourriture
Jour 35		— Vérifier le taux d'humidité du sol — Administrer la nourriture
Jour 42		— Compter les vers juvéniles — Mesurer le pH et le taux d'humidité du sol

▼M6

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

39. La présente méthode d'essai ne prescrit aucune démarche statistique stricte pour analyser les résultats de l'essai, bien que l'Appendice 7 en présente les grandes lignes.

40. Dans l'essai de détermination de l'ordre de grandeur, le principal effet observé est la mortalité. Les changements comportementaux (par exemple, l'incapacité de creuser le sol; la prostration contre la paroi du récipient expérimental) ou morphologiques (par exemple des blessures ouvertes) chez les vers adultes doivent néanmoins aussi être enregistrés, de même que la présence de vers juvéniles. Il faut normalement appliquer l'analyse probit (21) ou la régression logistique pour déterminer la CL_{50}. Toutefois, dans les cas où cette méthode d'analyse ne convient pas (par exemple si l'on obtient moins de trois concentrations engendrant une mortalité partielle), d'autres méthodes peuvent être utilisées, notamment les moyennes mobiles (22), la méthode de Spearman-Karber simplifiée (23) ou une simple interpolation (par exemple la moyenne géométrique de la CL_0 et de la CL_{100}, calculée en multipliant la racine carrée de la CL_0 par la CL_{100}).

41. Dans l'essai proprement dit, l'effet observé est la fécondité (c'est-à-dire le nombre de vers juvéniles produits). Néanmoins, comme dans l'essai de détermination de l'ordre de grandeur, tous les autres signes de nocivité doivent être consignés dans le rapport final. Pour calculer les résultats de la reproduction, il faut connaître la moyenne arithmétique et l'écart-type par traitement et par témoin afin d'effectuer l'analyse statistique.

42. Si on a pratiqué une analyse de la variance, l'écart-type, s, et les degrés de liberté, dl, peuvent être remplacés respectivement par l'estimation de la variance «fusionnée» obtenue par analyse de la variance (ANOVA) et par ses degrés de liberté, à condition que la variance ne dépende pas de la concentration. Dans ce cas, on utilisera les variances uniques des témoins et des échantillons traités. On calcule généralement ces valeurs à l'aide d'un logiciel statistique commercial, en utilisant les résultats par récipient comme des expériences identiques. Si la fusion des résultats relatifs aux témoins négatifs et au(x) témoin(s) contenant le solvant semble plus pertinente que de calculer les résultats de l'essai comparativement à l'un de ces deux témoins, il faudra vérifier à l'aide d'un test qu'ils ne présentent pas de différence significative (pour les tests appropriés, voir au paragraphe 45 et à l'Appendice 7).

43. Si les résultats des expériences identiques présentent une distribution normale et des variances homogènes, d'autres tests statistiques et déductions pourront être effectués.

Estimation de la CSEO

44. Il est préférable d'appliquer des tests puissants. Il faudrait savoir si les données ont une distribution à peu près normale, en se reportant, par exemple, aux expériences précédentes (essais tournants) ou à d'autres données antérieures. L'homogénéité de la variance est plus déterminante. On a constaté empiriquement que la variance s'accroît souvent lorsque la moyenne s'accroît. Dans ce cas, une transformation des données pourrait déboucher sur l'homogénéité de la variance. Néanmoins, cette transformation devrait s'appuyer sur des données antérieures plutôt que sur les données en cours d'étude. En présence de données homogènes, il faudrait recourir à des tests *t* de comparaison multiple, tels que le test de Williams (α= 0,05, unilatéral) (24)(25), ou, dans certains cas, le test de Dunnett (26)(27). Remarquons que, dans le cas d'une reproduction inégale, les valeurs de t en tableau doivent être corrigées, comme l'ont suggéré Dunnett et Williams. En présence d'une variation importante, il peut arriver que la croissance ou la décroissance des résultats ne soit pas régulière. Avec un tel écart à la

▼M6

monotonicité, le test de Dunnett est plus approprié. Si la variance n'est pas homogène, il peut être utile d'examiner de plus près les répercussions possibles sur la variance afin de déterminer si les tests t peuvent être appliqués sans perdre beaucoup en puissance (28). Sinon, un test U de comparaison multiple, par exemple un test U de Bonferroni selon Holm (29), ou, si ces données présentent une variance hétérogène, mais concordent par ailleurs avec une relation dose-effet sous-jacente monotone, un autre test non paramétrique [par exemple un test de Jonckheere-Terpstra (30)(31) ou de Shirley (32)(33)] peuvent être appliqués et sont généralement préférables aux tests *t* à variance inégale. (voir aussi le schéma exposé à l'Appendice 7).

45. Si un essai limite a été conduit et que les conditions requises par les tests paramétriques (normalité, homogénéité) sont remplies, le test t de Student en paire peut être utilisé ou, sinon, le test U de Mann-Whitney (29).

Estimation de la CE_x

46. Pour calculer une quelconque valeur de CE_x, on utilise la moyenne par traitement dans l'analyse de la régression (linéaire ou non linéaire), après avoir obtenu une fonction dose-effet appropriée. S'agissant de la croissance des vers considérée comme une réponse continue, les valeurs de la CE_x peuvent être estimées à l'aide d'une analyse de la régression adéquate (35). Les fonctions appropriées aux résultats épousant une valeur de tout ou rien (mortalité/survie et nombre de descendants produits) sont les fonctions sigmoïdes normales, logistiques ou de Weibull, à deux ou quatre paramètres, dont certaines peuvent aussi modéliser des réponses hormétiques. Si la fonction dose-effet a été ajustée par une analyse de la régression linéaire, il faudrait trouver un r2 (coefficient de détermination) et/ou une pente significatifs avant d'estimer la CE_x en insérant une valeur correspondant à x % de la moyenne du témoin dans l'équation obtenue par l'analyse de la régression. Des limites de confiance à 95 % sont calculées selon la méthode de Fieller (mentionnée par Finney (21)) ou par une autre méthode récente appropriée.

47. Sinon, la réponse est modélisée comme un pourcentage ou une proportion du paramètre du modèle, paramètre qui est interprété comme le résultat moyen du témoin. Dans ce cas, la courbe sigmoïde normale (logistique, Weibull) peut souvent être facilement ajustée aux résultats à l'aide de la régression probit (21). Dans ce cas, la fonction de pondération doit être ajustée pour les résultats métriques selon Christensen (36). Cependant, si on observe une hormèse, l'analyse probit doit être remplacée par une fonction logistique ou de Weibull à quatre paramètres, ajustée par une régression non linéaire (36). S'il est impossible d'ajuster une fonction dose-effet appropriée aux données, d'autres méthodes peuvent être utilisées pour estimer la CE_x et ses limites de confiance, telles que les moyennes mobiles d'après Thompson (22) et la méthode simplifiée de Spearman-Karber (23).

RAPPORT D'ESSAI

48. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Substance chimique d'essai:

— état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (par exemple hydrosolubilité, pression de vapeur);

— identification chimique de la substance chimique d'essai selon la nomenclature de l'IUPAC, numéro CAS, lot de fabrication, lot de conditionnement, formule structurale et pureté.

— date d'expiration de l'échantillon.

Espèce d'expérience

— animal d'expérience utilisé: espèce, nom scientifique, source et conditions d'élevage.

Conditions expérimentales:

— ingrédients et préparation du sol artificiel;

▼M6

— méthode d'application de la substance chimique d'essai;

— description des conditions expérimentales, notamment la température, le taux d'humidité, le pH, etc.;

— description complète de la conception de l'essai et du mode opératoire.

Résultats de l'essai:

— mortalité des vers adultes après deux semaines et nombre de vers juvéniles à la fin de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur;

— mortalité des vers adultes après trois semaines d'exposition et recensement complet des vers juvéniles à la fin de l'essai proprement dit;

— tout symptôme physique ou pathologique et changement comportemental observé chez les organismes d'expérience;

— CL_{50}, CSEO et/ou CE_x (par exemple CE_{50}, CE_{10}) pour la reproduction si certaines d'entre elles sont applicables avec des intervalles de confiance et représentation graphique du modèle ajusté utilisé pour leur calcul, toutes les informations et observations utiles à l'interprétation des résultats.

Écarts par rapport aux procédures décrites dans la présente méthode d'essai et faits inhabituels survenus au cours de l'essai.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Römbke, J. (1989). Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen — Enchytraeen. Abschlußbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.

(2) Römbke, J. and Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 pp.

(3) Westheide, W. and Bethge Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, In: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Ed. by Esser, G. and Overdieck, D. pp 497-508. Elsevier, Amsterdam,

(4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.

(5) Chapitre C.8 de la présente annexe, Toxicité pour les vers de terre.

(6) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1993). Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (Eisenia fetida) Partie 1: Détermination de la toxicité aiguë en utilisant des substrats de sol artificiel. No 11268-1. ISO, Genève.

(7) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1996). Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (Eisenia fetida) Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction. No 11268-2. ISO, Genève.

(8) Rundgren, S. and A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid Cognettia shagnetorum (Vejdovsky 1877). In: Løkke, H. and C.A.M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, 73-94.

(9) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23, 217-232.

(10) Römbke, J. (1995). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 246-249.

(11) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

▼M6

(12) Didden, W.A.M. (1993). Ecology of terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37, 2-29.

(13) Becker, H. (1991). Bodenorganismen — Prüfungskategorien der Forschung. UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 19-24.

(14) Römbke, J. and Federschmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79-96.

(15) Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Enchytraeen als Testorganismen. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

(16) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1994). Qualité du sol — Détermination du pH. n0 10390. ISO, Genève.

(17) Bell, A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902, 1-13.

(18) Nielsen, C.O. and Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. Natura Jutlandica 8-9, 1-160.

(19) Bouguenec, V. and Giani, N. (1987). Deux nouvelles espèces d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et redescription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. Ann. Limnol. 23, 9-22.

(20) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.

(21) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

(22) Finney, D.J. (1978). Statistical method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.

(23) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

(24) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

(25) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

(26) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

(27) Dunnett, C.W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

(28) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361.

(29) Holm, S., (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

(30) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

(31) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

(32) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

▼**M6**

(33) Williams, D.A. (1986). A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.

(34) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

(35) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

(36) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

▼**M6**

Appendice 1

Définitions

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente méthode d'essai:

Substance chimique: une substance ou un mélange.

CE_x (concentration efficace à x %): concentration qui engendre un effet de x % sur les organismes d'expérience durant une période d'exposition déterminée, en comparaison avec un témoin. Dans cet essai, les concentrations efficaces sont exprimées en masse de substance chimique d'essai par masse sèche de sol expérimental.

CL_0 (concentration non létale): concentration d'une substance chimique d'essai qui ne tue aucun des organismes d'expérience exposés durant une période déterminée. Dans cet essai, la CL_0 s'exprime en masse de substance chimique d'essai par masse sèche de sol expérimental.

CL_{50} (concentration létale moyenne): concentration d'une substance chimique d'essai qui entraîne la mort de 50 % des organismes d'expérience exposés durant une période déterminée. Dans cet essai, la CL_{50} s'exprime en masse de substance chimique d'essai par masse sèche de sol expérimental.

CL_{100} (concentration totalement létale): concentration d'une substance chimique d'essai qui entraîne la mort de 100 % des organismes d'expérience exposés durant une période déterminée. Dans cet essai, la CL_{100} s'exprime en masse de substance chimique d'essai par masse sèche de sol expérimental.

CMEO (concentration minimale avec effet observé): la plus faible concentration de la substance chimique d'essai qui exerce un effet statistiquement significatif ($p < 0,05$). Dans cet essai, la CMEO s'exprime en masse de substance chimique d'essai par masse sèche de sol expérimental. Toutes les concentrations expérimentales supérieures à la CMEO doivent normalement produire un effet statistiquement différent du résultat observé sur le témoin. Tous les écarts à ce qui précède dans la détermination de la CMEO doivent être justifiés dans le rapport d'essai.

CSEO (concentration sans effet observé): la plus haute concentration de la substance chimique d'essai directement inférieure à la CMEO et à laquelle aucun effet n'est observé. Dans cet essai, la concentration correspondant à la CSEO n'a pas d'effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) durant une période d'exposition donnée, en comparaison avec le témoin.

Taux de reproduction: rapport du nombre moyen de vers juvéniles produits par le nombre d'adultes durant la période de l'essai.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼**M6**

Appendice 2

Détermination de la capacité maximale de rétention d'eau

Détermination de la capacité de rétention d'eau du sol artificiel

La méthode suivante a fait ses preuves. Elle est décrite à l'annexe C de la norme ISO DIS 11268-2

Prélevez une quantité déterminée (5 g, par exemple) du sol expérimental servant de substrat à l'aide d'un instrument approprié (tarière, etc.). Couvrez le fond de la tarière avec un morceau de papier filtre et, après l'avoir remplie d'eau, placez-la sur un support dans un bain d'eau. La tarière doit être progressivement submergée jusqu'à ce que le niveau d'eau dépasse le sommet de la carotte de sol. Laissez la tarière dans l'eau durant environ trois heures. Comme l'eau absorbée par les capillaires du sol ne peut pas être retenue en totalité, laissez l'échantillon de sol dégorger durant deux heures en plaçant le tube sur un lit de sable quartzique fin très humide contenu dans un récipient fermé (pour empêcher le séchage). Pesez l'échantillon et séchez-le à 105 °C jusqu'à ce qu'il atteigne une masse constante. La capacité de rétention d'eau (CRE) se calcule comme suit:

$$\text{CRE (en \% de masse sèche)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

où:

S = masse du substrat saturé en eau + masse de la tarière + masse du papier filtre

T = tare (masse de la tarière + masse du papier filtre)

D = masse sèche du substrat

RÉFÉRENCES:

ISO (Organisation internationale de normalisation) (1996). Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction. No 11268-2. ISO, Genève.

▼**M6**

Appendice 3

Détermination du pH du sol

La méthode de détermination du pH d'un échantillon de sol, décrite ci-dessous, s'appuie sur la norme ISO 10390 (Qualité du sol — Détermination du pH).

Laissez sécher une quantité définie de sol à température ambiante durant au moins 12 heures. Confectionnez une suspension du sol (contenant au moins 5 g de sol) dans cinq fois le volume du sol soit d'une solution de chlorure de potassium (KCl) 1 M de qualité pour analyse, soit d'une solution de chlorure de calcium ($CaCl_2$) 0,01 M de qualité pour analyse. Agitez énergiquement la suspension durant cinq minutes. Laissez reposer la suspension durant au moins deux heures, mais pas plus de 24 heures. Mesurez le pH de la phase liquide à l'aide d'un pH-mètre, étalonné avant chaque mesure avec une série appropriée de solutions tampons (pH 4,0 et 7,0, par exemple).

RÉFÉRENCES:

ISO (Organisation internationale de normalisation) (1994). Qualité du sol — Détermination du pH. N° 10390. ISO, Genève.

▼**M6**

Appendice 4

Conditions de culture d'*Enchytraeus* sp.

Les enchytrées de l'espèce *Enchytraeus albidus* (ainsi que d'autres espèces d' *Enchytraeus*) peuvent être cultivés dans de grandes boîtes en plastique (30 × 60 × 10 cm, par exemple) garnies d'un mélange 1/1 de sol artificiel et de sol naturel de jardin non contaminé. L'emploi de compost, qui risque de contenir des substances chimiques toxiques, telles que des métaux lourds, est à éviter. La faune doit être éliminée du sol avant utilisation de ce dernier (par congélation, par exemple). Un substrat composé uniquement de sol artificiel peut être utilisé, mais le taux de reproduction risque d'être inférieur à celui obtenu avec un sol mixte. Le substrat destiné à la culture doit avoir un pH de 6,0 ± 0,5.

La culture est gardée à l'obscurité à une température de 15 à 20 °C ± 2 °C. La température ne devrait pas dépasser 23 °C. Le sol doit rester humide sans s'engorger. L'humidité du sol est correcte si, lorsqu'on presse doucement une poignée de sol dans une main, de petites gouttes d'eau perlent entre les doigts. On évitera de créer des conditions anoxiques en s'assurant que les couvercles des récipients de culture autorisent suffisamment d'échanges gazeux avec l'atmosphère. Il faudrait retourner soigneusement le sol chaque semaine pour favoriser l'aération.

Les vers peuvent être nourris avec des flocons d'avoine. Les flocons doivent être conservés dans des récipients hermétiquement fermés, et autoclavés ou chauffés avant l'emploi afin de prévenir une infestation par des mites de la farine (*Glyzyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*, par exemple) ou des mites prédatrices [(*Hypoaspis* (*Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*, par exemple)]. Après avoir été chauffés, les flocons doivent être moulus de façon à pouvoir être facilement parsemés à la surface du sol. De temps à autre, la ration de flocons d'avoine pourra être enrichie de vitamines, de lait et d'huile de foie de morue. D'autres aliments, tels que la levure de boulanger et la nourriture pour poissons «Tetramin», conviennent également.

La ration alimentaire est administrée environ deux fois par semaine. Une quantité appropriée de flocons d'avoine est répandue à la surface du sol ou délicatement mélangée au substrat lorsqu'on remue le sol pour favoriser l'aération. La quantité absolue de nourriture fournie dépend du nombre de vers peuplant le substrat. À titre indicatif, la ration doit être augmentée si elle est entièrement consommée le jour où elle a été donnée. Par contre, si des restes de nourriture subsistent encore à la surface du sol lors de l'administration de la deuxième ration (une semaine plus tard), la ration doit être diminuée. La nourriture contaminée par des champignons doit être enlevée et remplacée. Après trois mois, les vers sont transférés dans un substrat fraîchement préparé.

Les conditions de culture sont jugées satisfaisantes si les vers: a) ne tentent pas de quitter le substrat, b) se déplacent rapidement dans le sol, c) présentent une surface extérieure brillante sur laquelle les particules de sol n'adhèrent pas, d) ont une couleur plus ou moins blanchâtre, e) présentent diverses tranches d'âge et f) se reproduisent continuellement.

▼M6

Appendice 5

Conduite de l'essai avec d'autres espèces d'*Enchytraeus*

Sélection des espèces

Il est possible d'utiliser d'autres espèces qu'*E. albidus*, mais le mode opératoire et les critères de validité doivent être adaptés en conséquence. Comme de nombreuses espèces d'*Enchytraeus* sont faciles à se procurer et supportent bien les conditions de laboratoire, le critère le plus important pour sélectionner une espèce autre qu'*E. albidus*, est sa pertinence écologique et, d'autre part, sa sensibilité comparable. On est parfois obligé d'utiliser une autre espèce d'*Enchytraeus*; par exemple, dans les pays où *E. albidus* est absent et impossible à importer (en raison de restrictions imposées par une quarantaine, par exemple).

Exemples d'autres espèces appropriées

— *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe, 1992): Ces dernières années, cette espèce a souvent été utilisée dans des études écotoxicologiques en raison de sa facilité d'élevage et de mise à l'essai. Néanmoins, elle est petite, ce qui la rend plus difficile à manipuler qu'*E. albidus* (en particulier aux stades précédant l'emploi de la méthode de coloration). L'existence d'*E. crypticus* dans la nature n'est pas certaine, cette espèce n'ayant été décrite que dans les cultures de lombrics. Aussi, ses besoins écologiques sont-ils inconnus.

— *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky, 1879): Ce nom recouvre probablement un groupe d'espèces très proches, difficiles à distinguer sur le plan morphologique. Son usage à des fins expérimentales est déconseillé si les individus destinés à l'essai ne peuvent être identifiés jusqu'au niveau de l'espèce. *E. buchholzi* fréquente habituellement les prairies et des sites dérangés tels que les bords de routes.

— *Enchytraeus luxuriosus*: Dénommée à l'origine *E. minutus*, cette espèce a été décrite récemment (1). Elle a été découverte pour la première fois par U. Graefe (Hambourg) dans une prairie proche de St. Peter-Ording (Schleswig-Holstein, Allemagne). *E. luxuriosus* atteint environ la moitié de la taille d'E. albidus, mais est plus grand que les autres espèces décrites ici, ce qui pourrait en faire un bon remplaçant d'*E. albidus*.

— *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen & Christensen, 1963): Jusqu'à présent, la présence de cette espèce a été signalée dans des sols minéraux allemands et espagnols, où elle est commune, mais généralement pas très abondante. En comparaison avec d'autres petites espèces de ce genre, elle est relativement facile à identifier. On ne sait rien de son comportement dans des essais de laboratoire, ni de sa sensibilité aux produits chimiques. Néanmoins, elle s'est avérée facile à cultiver (E. Belotti, communication personnelle).

Conditions d'élevage

Toutes les espèces d'*Enchytraeus* susmentionnées peuvent être cultivées sur les mêmes substrats qu'*E. albidus*. Comme elles sont plus petites, elles peuvent être cultivées dans des récipients plus petits et recevoir une ration alimentaire de la même composition, mais plus réduite. Ces espèces ayant un cycle de vie plus court qu'*E. albidus*, elles doivent être nourries plus fréquemment.

Conditions expérimentales

Les conditions expérimentales sont généralement identiques à celles qui s'appliquent à *E. albidus*, à ceci près que:

— la dimension des récipients expérimentaux peut (mais ne doit pas) être inférieure;

— la durée de l'essai de reproduction peut (mais ne doit pas) être plus courte, c'est-à-dire quatre au lieu de six semaines, mais la durée de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur ne doit pas être modifiée;

— compte tenu de la petitesse des vers juvéniles, l'utilisation de la méthode de coloration est fortement recommandée pour le comptage;

— le critère de validité relatif au «nombre de vers juvéniles par récipient témoin» doit être porté à «50».

▼**M6**

RÉFÉRENCES

(1). Schmelz, R.M. and Collado, R. (1999). Enchytraeus luxuriosus sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). Carolinea 57, 93-100.

▼M6

Appendice 6

Description détaillée des techniques d'extraction

Coloration au rouge de Bengale

Cette méthode, développée à l'origine en écologie limnique (1) a été proposée la première fois pour le dénombrement des enchytrées juvéniles dans un essai de reproduction des enchytrées par W. de Coen (Université de Gand, Belgique). Une version modifiée (rouge de Bengale mélangé avec du formaldéhyde au lieu de l'éthanol) a été mise au point indépendamment par le RIVM (Bilthoven, Pays-Bas) (2)(3).

À la fin de l'essai proprement dit (après six semaines), le sol des récipients expérimentaux est transféré dans un récipient peu profond. Un récipient Bellaplast ou une cuve de développement photographique munie d'un fond strié sont utiles à cet effet, et ce, dans le cas de la cuve, parce que les stries restreignent le mouvement des vers dans le champ d'observation. Les vers juvéniles sont fixés avec de l'éthanol (environ 5 ml par expérience identique). Ensuite, les récipients sont remplis d'eau sur une hauteur de 1 à 2 cm. On ajoute quelques gouttes (200 à 300µl) de rouge de Bengale (solution à 1 % dans de l'éthanol) ou d'une solution d'éosine à 0,5 % et les deux composés sont soigneusement mélangés. Après 12 heures, les vers devraient présenter une coloration rougeâtre et être faciles à compter car ils reposeront à la surface du substrat. Une autre possibilité consiste à tamiser le mélange substrat/alcool (dimension des mailles: 0,250 mm) avant le comptage des vers. De cette manière, la kaolinite, la tourbe et une partie du sable seront évacuées à travers le tamis et les vers colorés en rouge seront plus faciles à voir et à compter. L'utilisation de loupes éclairées (dimension des lentilles: au moins 100 × 75 mm, avec un facteur d'agrandissement de 2 à 3) facilitera également le comptage.

La technique de coloration réduit la durée du comptage à quelques minutes par récipient et, à titre indicatif, une seule personne devrait pouvoir évaluer tous les récipients d'un essai en deux jours maximum.

Extraction par voie humide

L'extraction par voie humide doit être pratiquée immédiatement après la fin de l'essai. Le sol de chaque récipient expérimental est versé dans des tamis en plastique dont les trous mesurent environ 1 mm. Les tamis sont ensuite suspendus dans des bols en plastique sans toucher le fond. On verse doucement de l'eau dans les bols jusqu'à ce que les échantillons contenus dans les tamis soient complètement submergés. Pour obtenir un taux de récupération de plus de 90 % des vers présents, la période d'extraction doit durer 3 jours à 20 ± 20C. À la fin de la période d'extraction, on enlève les tamis et on laisse l'eau décanter lentement (exception faite d'une petite quantité), en prenant soin de ne pas remuer le sédiment au fond des bols. Ensuite, on agite légèrement les bols en plastique pour suspendre le sédiment dans l'eau sus-jacente. L'eau est transférée dans une boîte de Petri et, après le dépôt des particules de sol, les enchytrées peuvent être identifiés, enlevés et comptés sous un stéréomicroscope, à l'aide de pinces souples en acier.

Flottation

Une méthode fondée sur la flottation a été décrite dans une note rédigée par R. Kuperman (4). Après avoir fixé le contenu du récipient expérimental avec de l'éthanol, on submerge le sol en versant du Ludox (silice colloïdale AM-30, suspension aqueuse à 30 % en poids) jusqu'à une hauteur de 10 à 15 mm au-dessus de la surface du sol. Après que le sol a été bien mélangé à l'agent de flottation durant 2 à 3 minutes, les vers juvéniles flottant à la surface se comptent aisément.

RÉFÉRENCES

(1) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.

▼**M6**

(2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta*, *Annelida*) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.

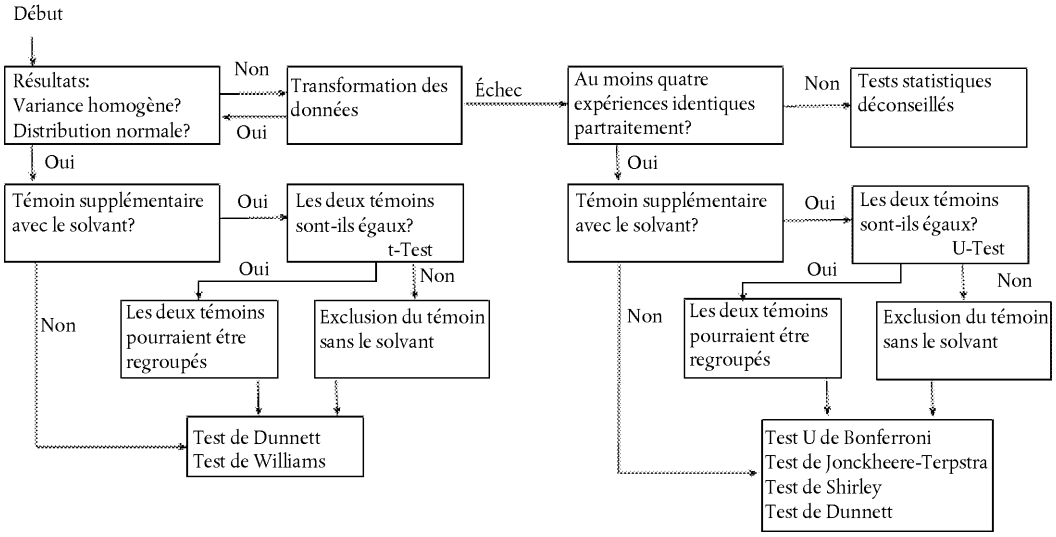
(3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. en Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. Ecotox. Envir. Safety 38, 108-121.

(4) Phillips, C.T., Checkai, R.T. and Kuperman, R.G. (1998). An alternative to the OConnor Method for Extracting Enchytraeids from soil. SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, USA. Abstract Book No. PMP069, p. 157.

▼**M6**

Appendice 7

Description schématique de l'évaluation statistique des résultats (détermination de la CSEO)



▼M6

C.33. **ESSAI DE REPRODUCTION CHEZ LE LOMBRIC (*EISENIA FETIDA /EISENIA ANDREI*)**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 222 (2004) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Elle est destinée à évaluer les effets des substances chimiques dans le sol sur le taux de reproduction (et sur d'autres critères sub-létaux) de deux espèces de lombric: *Eisenia fetida* (Savigny 1826) ou *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1)(2). Cet essai a fait l'objet d'un essai tournant (3). Une méthode d'essai existe pour les essais de toxicité aiguë sur le ver de terre (4). Plusieurs autres lignes directrices nationales et internationales pour les essais de toxicité aiguë et chronique sur le lombric ont été publiées (5)(6)(7)(8).

2. *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei* sont considérés comme des représentants de la pédofaune et des vers de terre en particulier. Il existe des informations de référence sur l'écologie des vers de terre et leur utilisation dans les essais d'écotoxicité (7)(9)(10)(11)(12).

PRINCIPE DE L'ESSAI

3. Les vers adultes sont exposés à une série de concentrations de la substance chimique d'essai, soit mélangée au sol, soit, dans le cas des pesticides, appliquée dans ou sur le sol selon des procédures imitant le mode d'emploi de la substance. La méthode d'application dépend de la finalité de l'essai. La gamme de concentrations choisie doit couvrir les concentrations susceptibles de provoquer des effets à la fois sublétaux et létaux sur une période de huit semaines. La mortalité et les effets sur la croissance des vers adultes sont déterminés après quatre semaines d'exposition. Ensuite, les adultes sont extraits du sol et on évalue les effets sur la reproduction à l'issue des quatre semaines suivantes en comptant le nombre de descendants présents dans le sol. On compare le taux de reproduction des vers exposés à la substance chimique d'essai à celui du (des) témoin(s), afin de déterminer i) la concentration sans effet observé (CSEO) et/ou ii) la CE_x (par exemple CE_{10}, EC_{50}), en utilisant un modèle de régression pour estimer la concentration qui entraînerait une réduction de x % du taux de reproduction. Les concentrations expérimentales doivent couvrir la CE_x (CE_{10}, CE_{50}, par exemple) de façon à ce que la CE_x soit interpolée plutôt qu'extrapolée (voir les définitions à l'Appendice 1).

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE CHIMIQUE D'ESSAI

4. Il faudrait connaître les informations suivantes sur la substance chimique d'essai pour pouvoir définir le mode opératoire approprié:

   — hydrosolubilité;

   — log K_{oe};

   — pression de vapeur;

   — si possible, données sur le devenir et le comportement dans l'environnement (par exemple, vitesse de photolyse et d'hydrolyse si ces paramètres sont pertinents au regard du mode d'application de la substance d'essai).

5. La présente méthode d'essai s'applique à toutes les substances chimiques, indépendamment de leur solubilité dans l'eau. La méthode ne convient pas aux substances volatiles, définies ici comme des substances dont la constante de Henry ou le coefficient de partage air/eau sont supérieurs à un, ni aux substances dont la pression de vapeur excède 0,0133 Pa à 25 °C.

6. La présente méthode d'essai ne tient pas compte de l'éventuelle dégradation de la substance chimique d'essai au cours de l'essai. Par conséquent, il est impossible de garantir que les concentrations d'exposition conserveront leur valeur initiale tout au long de l'essai. Dans ce cas, il est recommandé d'effectuer une analyse chimique de la substance chimique d'essai au début et à la fin de l'essai.

▼M6

SUBSTANCE CHIMIQUE DE RÉFÉRENCE

7. Il faut déterminer la CSEO et/ou la CE_x d'une substance chimique de référence pour s'assurer que les conditions expérimentales du laboratoire sont adéquates et vérifier que la réaction des organismes d'expérience ne change pas de façon statistiquement significative au fil du temps. Il est conseillé de tester une substance de référence au moins une fois par an, ou, lorsque les essais sont conduits moins fréquemment, parallèlement à la détermination de la toxicité d'une substance chimique d'essai. La carbendazime ou le bénomyl, qui affectent la reproduction, conviennent comme substances de référence (3). Des effets appréciables devraient apparaître entre a) 1 et 5 mg d'ingrédient actif/kg de masse sèche ou b) 250-500 g/ha ou 25-50 mg/m^2. Si un étalon toxique positif est inclus dans la série d'essais, on n'applique qu'une seule concentration et un nombre d'expériences identiques égal à celui des témoins.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

8. Les témoins devraient satisfaire aux critères suivants pour que le résultat de l'essai soit considéré comme valide:

— chaque expérience identique (sur 10 adultes) aura produit au moins 30 vers juvéniles à la fin de l'essai;

— le coefficient de variation de la reproduction est ≤ 30 %;

— la mortalité adulte durant les quatre premières semaines de l'essai est ≤ 10 %.

Un essai qui ne remplirait pas les critères de validité susmentionnés doit être abandonné, à moins que la poursuite de l'essai puisse être justifiée. Cette justification doit figurer dans le rapport d'essai.

DESCRIPTION DE L'ESSAI

Matériel

9. Il convient d'utiliser des récipients expérimentaux en verre ou en un autre matériau chimiquement inerte d'une capacité d'un à deux litres. Les récipients doivent avoir une section horizontale d'environ 200 cm^2, de sorte que l'ajout de 500 à 600 g de masse sèche de substrat donne un volume de substrat humide d'une profondeur de 5 à 6 cm. La forme du récipient doit permettre les échanges gazeux entre le substrat et l'atmosphère et laisser passer la lumière (couvercle transparent perforé, par exemple), tout en empêchant la fuite des vers. Si la quantité de substrat utilisée est nettement supérieure à 500 à 600 g par récipient expérimental, le nombre de vers doit être augmenté proportionnellement.

10. Cet essai requiert du matériel de laboratoire courant, en particulier:

— armoire à séchage;

— stéréomicroscope;

— pH-mètre et photomètre;

— balances suffisamment précises;

— instruments appropriés permettant de réguler la température;

— instruments appropriés permettant de réguler l'humidité (pas essentiel si les récipients expérimentaux ont des couvercles);

— incubateur ou petite chambre équipée d'un conditionnement de l'air;

— pinces, crochets ou anses;

— bain d'eau.

▼M6

Préparation du sol artificiel

11. Dans cet essai, on utilise un sol artificiel (5)(7) composé comme suit (en poids secs, séchés à 105 °C jusqu'à obtention d'un poids constant):

— 10 % de tourbe à sphaigne (pH aussi proche que possible de 5,5-6,0, pas de résidus visibles de plantes, finement broyée, séchée jusqu'à atteindre un taux d'humidité donné, mesuré);

— 20 % d'argile kaolinique (taux de kaolinite de préférence supérieur à 30 %);

— 0,3 à 1,0 % de carbonate de calcium ($CaCO_3$ pulvérisé, de qualité pour analyse) pour obtenir un pH initial de 6,0 ± 0,5;

— 70 % de sable quartzique (selon la quantité de $CaCO_3$ nécessaire) séché à l'air, composé en majorité de sable fin (plus de 50 % des particules mesurent entre 50 et 200 μm).

Remarque 1: La quantité de $CaCO_3$ requise dépendra des ingrédients du sol, y compris la nourriture, et devrait être déterminée par des mesures effectuées sur des sous-échantillons de sol immédiatement avant l'essai. Le pH est mesuré sur un échantillon de sol mélangé à une solution 1 M de chlorure de potassium (KCl) ou à une solution 0,01 M de chlorure de calcium ($CaCl_2$)(13).

Remarque 2: Il est possible de réduire la teneur en carbone organique du sol artificiel, par exemple en ramenant le pourcentage de tourbe à 4-5 % et en augmentant le taux de sable en conséquence. Cette réduction de la teneur en carbone organique est susceptible de diminuer les possibilités d'adsorption de la substance chimique d'essai sur le sol (carbone organique) et d'augmenter la disponibilité de la substance chimique d'essai pour les vers. Il a été démontré qu'Eisenia feù'da peut satisfaire aux critères de validité concernant la reproduction lorsqu'il est testé sur le terrain sur des sols dont la teneur en carbone organique est inférieure (2,7 %, par exemple) (14), et on a constaté expérimentalement que ce ver peut aussi satisfaire aux critères de validité lorsqu'il est mis à l'essai sur un sol artificiel renfermant 5 % de tourbe. Par conséquent, avant d'utiliser ce type de sol dans l'essai proprement dit, il n'est pas nécessaire de démontrer que le sol artificiel permet de répondre aux critères de validité, à moins que le taux de tourbe soit inférieur aux valeurs indiquées ci-dessus.

Remarque 3: Lorsqu'on utilise un sol naturel dans un essai supplémentaire (réalisé à un niveau supérieur dans le cadre d'essais séquentiels, par exemple), l'adéquation du sol à la culture des vers et au respect des critères de validité doit aussi être démontrée.

12. Les ingrédients secs du sol sont mélangés complètement (dans un grand mélangeur de laboratoire, par exemple) dans un endroit bien ventilé. Avant d'entamer l'essai, on humidifiera le sol artificiel sec avec suffisamment d'eau désionisée pour lui conférer environ la moitié de sa teneur finale en eau, à savoir 40 % à 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau (équivalant à 50 ± 10 % d'humidité par masse sèche). De cette manière, on obtient un substrat qui ne rejette pas d'eau libre ou dormante lorsqu'on le presse dans la main. La capacité maximale de rétention d'eau du sol artificiel est déterminée conformément à la procédure décrite à l'Appendice 2, à la norme ISO 11274 (15) ou à la norme UE équivalente.

13. Si la substance chimique d'essai est appliquée à la surface du sol ou mélangée au sol sans eau, la quantité finale d'eau peut être mélangée au sol artificiel durant la préparation du sol. Si la substance chimique d'essai est mélangée au sol avec une certaine quantité d'eau, l'eau supplémentaire peut être ajoutée en même temps que la substance chimique d'essai (voir paragraphe 19).

14. Le taux d'humidité du sol est déterminé au début et à la fin de l'essai, conformément à la norme ISO 11465 (16), et le pH du sol, suivant les instructions données à l'Appendice 3, dans la norme ISO 10390 (13) ou dans la norme UE équivalente. Ces déterminations devraient être conduites sur un échantillon de sol témoin et sur un échantillon de sol de chaque

▼M6

concentration de la substance d'essai. Le pH du sol ne doit pas être ajusté lorsque des substances acides ou basiques sont mises à l'essai. Il faudrait vérifier le taux d'humidité tout au long de l'essai en pesant périodiquement les récipients (voir paragraphe 26 et 30).

Sélection et préparation des animaux d'essai

15. L'espèce utilisée dans cet essai est *Eisenia fetida* ou *Eisenia andrei* (1)(2). Au début de l'essai, les vers sont adultes, âgés de deux mois à un an et pourvus d'un clitellum. Les vers devraient provenir d'une culture synchronisée offrant une structure d'âge relativement homogène (Appendice 4). L'âge des individus d'un même groupe d'essai ne devrait pas s'écarter de plus de 4 semaines.

16. On acclimate les vers sélectionnés pendant au moins un jour dans le type de sol artificiel utilisé pendant l'essai. Durant cette période, les vers reçoivent la même nourriture qu'au cours de l'essai (voir paragraphes 31 à 33).

17. Les vers sont pesés individuellement et répartis au hasard, par groupes de dix, dans les récipients expérimentaux au début de l'essai. Avant la pesée, on lave les vers avec de l'eau désionisée, puis on les dépose un instant sur un papier filtre pour éponger l'excès d'eau. La masse humide de chaque ver sera comprise entre 250 et 600 mg.

Préparation des concentrations expérimentales

18. Deux méthodes d'application de la substance chimique d'essai peuvent être utilisées: mélanger la substance d'essai au sol (voir paragraphes 19 à 21) ou l'appliquer à la surface du sol (voir paragraphes 22 à 24). La sélection de la méthode appropriée dépend de la finalité de l'essai. On recommande, en général, de mélanger la substance d'essai au sol. Cependant, il convient parfois de simuler les pratiques agricoles normales (par exemple, la pulvérisation de préparations liquides ou l'utilisation de présentations spéciales de pesticides telles que les granulés ou des produits de traitement des semences). Les solvants choisis pour faciliter le traitement du sol par la substance chimique d'essai seront peu toxiques pour les vers de terre et l'essai inclura un témoin traité au solvant, le cas échéant (voir paragraphe 27).

Incorporer la substance chimique d'essai au sol

Substance chimique d'essai hydrosoluble

19. Une solution de la substance chimique d'essai dans de l'eau désionisée est préparée juste avant le début de l'essai, en quantité suffisante pour toutes les expériences menées à la même concentration. Il est parfois nécessaire de faciliter la préparation de la solution expérimentale à l'aide d'un co-solvant. On prépare suffisamment de solution pour atteindre le taux d'humidité final (40 à 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau). La solution est mélangée complètement au sol avant d'être introduite dans le récipient expérimental

Substance chimique d'essai insoluble dans l'eau

20. La substance chimique d'essai est dissoute dans un petit volume d'un solvant organique approprié (par exemple de l'acétone), puis pulvérisée sur, ou mélangée à, une petite quantité de sable quartzique fin. Le solvant est ensuite éliminé par évaporation sous une hotte pendant au moins quelques minutes. Le sable traité est alors mélangé complètement au sol artificiel préhumidifié. On ajoute la quantité d'eau désionisée requise pour atteindre le taux d'humidité final, à savoir 40 à 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau, en la mélangeant au sol. Après quoi, le sol est prêt à être déversé dans les récipients expérimentaux. On veillera à ce que le solvant ne soit pas toxique pour les vers de terre.

▼**M6**

Substance chimique d'essai insoluble dans l'eau et dans les solvants organiques

21. On prépare un mélange composé de 10 g de sable quartzique industriel finement broyé et de la quantité nécessaire de substance d'essai pour obtenir la concentration expérimentale voulue dans le sol. Ce mélange est ensuite mélangé complètement au sol artificiel préhumidifié. On ajoute la quantité d'eau désionisée requise pour atteindre le taux d'humidité final, à savoir 40 à 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau, en la mélangeant au sol. Le sol est alors prêt à être déversé dans les récipients expérimentaux.

Application de la substance chimique d'essai à la surface du sol

22. Le sol est traité après l'ajout des vers. On verse le sol humidifié dans les récipients expérimentaux avant de déposer les vers, préalablement pesés, à la surface du sol. Normalement, un ver sain s'enfouit immédiatement dans le substrat, si bien que tous les vers subsistant à la surface après 15 minutes seront considérés comme lésés et devront être remplacés. Le cas échéant, les remplaçants et les vers écartés devront être pesés, de telle sorte que le poids vif total du groupe de vers exposés et le poids total du récipient contenant les vers soient connus au départ.

23. La substance chimique d'essai est appliquée. Elle ne doit pas être ajoutée au sol dans la demi-heure qui suit l'introduction des vers dans le récipient (ou si des vers sont présents à la surface du sol) de façon à éviter une exposition directe à la substance chimique d'essai par contact cutané. Si la substance d'essai est un pesticide, il peut être pertinent de l'appliquer à la surface du sol par pulvérisation. La substance d'essai devrait être répartie à la surface du sol de façon aussi régulière que possible, à l'aide d'un épandeur de laboratoire apte à simuler la pulvérisation sur un champ. Avant l'application, on enlève le couvercle des récipients expérimentaux et on le remplace par un revêtement interne protégeant les parois latérales du récipient des projections. Le revêtement peut être confectionné avec un récipient expérimental dont la base a été enlevée. L'application devrait avoir lieu à une température de 20 ± 2 °C et, s'agissant de solutions aqueuses, d'émulsions ou de dispersions, à un taux compris entre 600 et 800 $\mu l/m^2$. Il convient de vérifier le taux à l'aide d'une technique d'étalonnage appropriée. L'application des présentations spéciales, telles que les granulés ou les produits de traitement des semences, doit reproduire leur mode d'emploi en agriculture.

24. On laissera les récipients expérimentaux sans couvercle durant une heure pour permettre au solvant volatil associé à l'application de la substance chimique d'essai de s'évaporer, le cas échéant, en prenant garde qu'aucun ver ne s'échappe.

MODE OPÉRATOIRE

Groupes d'essai et témoins

25. Il est recommandé de déposer 10 vers par 500 à 600 g de masse sèche de sol artificiel (soit 50 à 60 g de sol par ver). Si l'on utilise de plus grandes quantités de sol, comme cela pourrait être le cas pour des pesticides exigeant un mode d'application spécial, tels les produits de traitement des semences, la charge de 50 à 60 g de sol par ver doit être maintenue moyennant l'augmentation du nombre de vers. On prépare dix vers par récipient témoin et traité. Les vers sont lavés à l'eau et essuyés, puis déposés un instant sur un papier absorbant pour éponger l'excès d'eau.

26. Afin d'éviter les erreurs systématiques dans la répartition des vers dans les récipients expérimentaux, on mesure l'homogénéité de la population expérimentale en pesant individuellement 20 vers prélevés au hasard dans la population qui fournira les vers d'expérience. Une fois l'homogénéité établie, des lots de vers sont sélectionnés, pesés et répartis dans les récipients expérimentaux selon un procédé de randomisation. Après l'introduction

▼M6

des vers d'expérience, il faut peser chaque récipient expérimental, de façon à obtenir un poids initial de référence pour la mesure du taux d'humidité du sol tout au long de l'essai, comme décrit au paragraphe 30. Les récipients expérimentaux sont ensuite couverts, comme décrit au paragraphe 9 et placés dans le local expérimental.

27. On prépare des témoins appropriés à chacune des méthodes d'application de la substance chimique d'essai décrites aux paragraphes 18 à 24. Les témoins sont préparés de la même façon que les récipients traités, sauf qu'ils ne contiennent pas la substance d'essai. Aussi, le cas échéant, les témoins renfermeront un solvant organique, du sable quartzique ou d'autres véhicules à des concentrations/quantités comparables à celles employées dans les récipients traités. Si la substance chimique d'essai est incorporée à l'aide d'un solvant ou d'un autre véhicule, il convient de préparer un témoin supplémentaire ne contenant ni le véhicule ni la substance d'essai, afin de s'assurer que le véhicule n'influence pas les résultats.

Conditions expérimentales

28. L'essai est conduit à 20 ± 2 °C, avec des cycles réglés de lumière et d'obscurité (de préférence 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité) et un éclairement de 400 à 800 lux dans la zone des récipients expérimentaux.

29. Les récipients expérimentaux ne sont pas aérés durant l'essai, mais les couvercles de ces récipients doivent autoriser les échanges gazeux avec l'atmosphère tout en limitant l'évaporation de l'humidité (voir paragraphe 9).

30. La teneur en eau du substrat des récipients expérimentaux est maintenue constante tout au long de l'essai. Pour ce faire, on pèse périodiquement les récipients sans leurs couvercles et on compense toute perte avec de l'eau désionisée. La teneur en eau ne doit pas varier de plus de 10 % par rapport à sa valeur au début de l'essai.

Alimentation

31. Toute nourriture dont la composition permet au moins de maintenir le poids des vers durant l'essai est jugée acceptable. Les flocons d'avoine, le crottin de cheval ou la bouse de vache ont fait leurs preuves à cet égard. Il faudra s'assurer que les vaches ou les chevaux dont on recueille les déjections ne font pas l'objet d'un traitement vétérinaire avec des substances telles que des activateurs de croissance, des nématicides ou des produits analogues, susceptibles d'être nocives pour les vers durant l'essai. Il est recommandé de ramasser soi-même la bouse de vache, l'expérience ayant démontré que la bouse de vache vendue dans le commerce comme engrais de jardin risque de nuire aux vers. Les déjections doivent être séchées à l'air, finement broyées et pasteurisées avant emploi.

32. Avant de l'utiliser dans l'essai, on administre chaque nouveau lot de nourriture à une culture de vers non expérimentale, afin de vérifier qu'il est d'une qualité appropriée. La croissance et la production des cocons ne devraient pas diminuer par rapport à celles de vers élevés dans un substrat ne contenant pas le nouveau lot de nourriture [conditions décrites dans la méthode d'essai C.8 (4)].

33. La première fois, la nourriture est administrée un jour après l'introduction des vers et l'ajout de la substance chimique d'essai au sol. Environ 5 g de nourriture sont parsemés à la surface du sol de chaque récipient et humidifiés avec de l'eau désionisée (quelque 5 à 6 ml par récipient). Ensuite, la nourriture est dispensée une fois par semaine au cours des quatre semaines de l'essai. Si des restes de nourriture subsistent, il faudra diminuer la ration

▼M6

afin d'éviter une croissance fongique, ou des moisissures. Les adultes sont retirés du sol au 28ème jour de l'essai. Cinq grammes supplémentaires de nourriture sont fournis à chaque récipient expérimental. Aucune nourriture supplémentaire n'est administrée durant les quatre semaines restantes de l'essai.

Sélection des concentrations expérimentales

34. Une connaissance préalable de la toxicité de la substance chimique d'essai, tirée, par exemple, d'un essai de toxicité aiguë (4) et/ou d'une étude de détermination de l'ordre de grandeur, devrait faciliter la sélection des concentrations expérimentales appropriées. Une étude de détermination de l'ordre de grandeur est menée, s'il y a lieu, avec, par exemple, cinq concentrations expérimentales: 0,1, 1,0, 10, 100 et 1 000 mg/kg (masse sèche de sol). Une expérience identique par traitement et témoin suffit. L'étude de détermination de l'ordre de grandeur dure deux semaines et l'on évalue la mortalité à la fin de l'essai.

Conception expérimentale

35. Comme aucun traitement statistique défini ne peut être prescrit pour cet essai, la présente méthode d'essai fournit des instructions pour déterminer la CSEO et la CE_x. La CSEO sera vraisemblablement demandée par les autorités réglementaires dans un avenir proche. L'usage de la CE_x pourrait se généraliser à court terme, pour des raisons statistiques et écologiques. Aussi, la présente méthode d'essai propose-t-elle trois conceptions fondées sur des recommandations émises à l'issue de l'essai tournant d'une méthode d'essai de reproduction chez l'enchytrée (17):

36. En sélectionnant la gamme de concentrations à appliquer, on tiendra compte des aspects suivants:

— s'agissant de déterminer la CSEO, il faudrait tester au moins cinq/douze concentrations formant une série géométrique. Il est recommandé d'inclure quatre expériences identiques pour chaque concentration expérimentale et huit témoins. Les concentrations devraient être espacées d'un facteur n'excédant pas 2,0.

— s'agissant de déterminer la CEx (CE_{10}, CE_{50}, par exemple), il est recommandé de prévoir suffisamment de concentrations différentes pour obtenir au moins quatre réponses moyennes statistiquement différentes à ces concentrations. Il conviendrait d'inclure au moins deux expériences identiques par concentration expérimentale et six témoins identiques. Le facteur d'espacement peut varier: il doit être inférieur ou égal à 1,8 dans la gamme censée produire un effet et supérieur à 1,8 aux concentrations supérieures et inférieures.

— une démarche combinée permet de déterminer à la fois la CSEO et la CE_x. On utilise huit concentrations formant une série géométrique. Il est recommandé d'inclure quatre expériences identiques par traitement et huit témoins. Les concentrations devraient être espacées d'un facteur n'excédant pas 1,8.

Durée de l'essai et mesures

37. Le 28ème jour, les vers adultes vivants sont observés et comptés. Tout comportement inhabituel (incapacité de creuser le sol, prostration, par exemple) et changement morphologique (blessures ouvertes, par exemple) sont également notés. Tous les vers adultes sont ensuite retirés des récipients expérimentaux, comptés et pesés. Le transfert du sol renfermant les vers sur un plateau propre, avant l'évaluation, peut faciliter la recherche des adultes. Avant d'être pesés, les vers extraits du sol devraient être lavés avec de l'eau désionisée et déposés un instant sur un papier filtre qui absorbera l'eau excédentaire. Tous les vers non retrouvés à cette étape doivent être consignés comme morts, on suppose en effet que ces vers sont morts et ont été décomposés avant l'évaluation.

▼M6

38. Si le sol a été retiré des récipients, il faut l'y remettre (sans les vers adultes mais avec tous les cocons engendrés, le cas échéant). Le sol est ensuite incubé durant quatre semaines supplémentaires dans les mêmes conditions expérimentales, si ce n'est que la nourriture n'est administrée qu'une seule fois, au début de cette phase de l'essai (voir paragraphe 33).

39. À la fin de la seconde période de quatre semaines, on dénombre les vers juvéniles éclos des cocons dans le sol expérimental et les cocons, en utilisant les procédures décrites à l'Appendice 5. Tous les signes de nocivité ou les lésions observés sur les vers doivent aussi être enregistrés tout au long de la durée de l'essai.

Essai limite

40. Si aucun effet n'est observé à la plus haute concentration de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur (1 000 mg/kg), l'essai de reproduction est à conduire comme un essai limite, avec une concentration expérimentale de 1 000 mg/kg. L'essai limite permettra de démontrer que la CSEO pour la reproduction est supérieure à la concentration limite et de réduire au minimum le nombre de vers utilisé dans l'essai. Cet essai comprend huit expériences identiques à la fois pour le sol traité et pour le témoin.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

41. La présente méthode d'essai ne prescrit aucune démarche statistique stricte pour analyser les résultats de l'essai, bien que l'Appendice 6 en présente les grandes lignes.

42. L'un des effets observés est la mortalité. Les changements comportementaux (par exemple, l'incapacité de creuser le sol, la prostration contre la paroi en verre du récipient expérimental) ou morphologiques (par exemple des blessures ouvertes) chez les vers adultes doivent néanmoins aussi être enregistrés, de même que la présence de vers juvéniles. La CL_{50} se détermine normalement par analyse probit (18) ou régression logistique. Toutefois, dans les cas où cette méthode d'analyse ne convient pas (par exemple si l'on obtient moins de trois concentrations engendrant une mortalité partielle), d'autres méthodes peuvent être utilisées, notamment les moyennes mobiles (19), la méthode de Spearman-Karber simplifiée (20) ou une simple interpolation (par exemple la moyenne géométrique de la CL_0 et de la CL_{100}, calculée en multipliant la racine carrée de la CL_0 par la CL_{100}).

43. L'autre effet observé est la fécondité (le nombre de vers juvéniles produits). Néanmoins, comme pour l'essai de détermination de l'ordre de grandeur, tous les autres signes de nocivité doivent être mentionnés dans le rapport final. Pour calculer les résultats de la reproduction, il faut connaître la moyenne arithmétique $\bar{x}$ et l'écart-type par traitement et par témoin afin d'effectuer l'analyse statistique.

44. Si l'on a pratiqué une analyse de la variance, l'écart-type, s, et les degrés de liberté, dl, peuvent être remplacés respectivement par l'estimation de la variance «fusionnée» obtenue par analyse de la variance (ANOVA) et par ses degrés de liberté, à condition que la variance ne dépende pas de la concentration. Dans ce cas, on utilisera les variances uniques des récipients témoins et traités. On calcule généralement ces valeurs à l'aide d'un logiciel statistique commercial, en utilisant les résultats par récipient comme des expériences identiques. Si la fusion des résultats relatifs aux témoins négatifs et au(x) témoin(s) contenant le solvant semble plus pertinente que de calculer les résultats de l'essai comparativement à l'un de ces deux témoins, il faudra vérifier à l'aide d'un test qu'ils ne présentent pas de différence significative (pour le test approprié, voir au paragraphe 47 et à l'Appendice 6).

45. Si les résultats des expériences identiques présentent une distribution normale et des variances homogènes, d'autres tests statistiques et déductions pourront être effectués.

▼M6

Estimation de la CSEO

46. Il est préférable d'appliquer des tests puissants. Il faudrait savoir si les données ont une distribution à peu près normale, en se reportant, par exemple, aux expériences précédentes (essais tournants) ou à d'autres données antérieures. L'homogénéité de la variance est plus critique. On a constaté empiriquement que la variance s'accroît souvent lorsque la moyenne s'accroît. Dans ce cas, une transformation des données pourrait déboucher sur l'homogénéité de la variance. Néanmoins, cette transformation devrait s'appuyer sur des données antérieures plutôt que sur les données en cours d'étude. En présence de données homogènes, il faudrait recourir à des tests *t* de comparaison multiple, tels que le test de Williams (α = 0,05, unilatéral) (21)(22), ou, dans certains cas, le test de Dunnett (23)(24). Remarquons que, dans le cas d'une reproduction inégale, les valeurs de t en tableau doivent être corrigées, comme l'ont suggéré Dunnett et Williams. En présence d'une variation importante, il peut arriver que la croissance ou la décroissance des résultats ne soit pas régulière. Avec un tel écart à la monotonicité, le test de Dunnett est plus approprié. Si la variance n'est pas homogène, il peut être utile d'examiner de plus près les répercussions possibles sur la variance afin de déterminer si les tests t peuvent être appliqués sans perdre beaucoup en puissance (25). Sinon, un test U de comparaison multiple, par exemple un test U de Bonferroni selon Holm (26), ou, si ces données présentent une variance hétérogène, mais concordent par ailleurs avec une relation dose-effet sous-jacente monotone, un autre test non paramétrique (par exemple un test de Jonckheere-Terpstra (27)(28) ou de Shirley (29)(30)) peuvent être appliqués et sont généralement préférables aux tests de t à variance inégale. (voir aussi le schéma exposé à l'Appendice 6).

47. Si un essai limite a été conduit et que les conditions requises pour les tests paramétriques (normalité, homogénéité) sont remplies, le test t de Student en paire peut être utilisé ou, sinon, le test U de Mann-Whitney (31).

Estimation de la CE_x

48. Pour calculer une quelconque valeur de CE_x, on utilise la moyenne par traitement dans l'analyse de la régression (linéaire ou non linéaire), après avoir obtenu une fonction dose-effet appropriée. S'agissant de la croissance des vers considérée comme une réponse continue, les valeurs de la CE_x peuvent être estimées à l'aide d'une analyse de la régression adéquate (32). Les fonctions appropriées aux résultats épousant une valeur de tout ou rien (mortalité/survie) et le nombre de descendants sont les fonctions sigmoïdes normales, logistiques ou de Weibull, à deux ou quatre paramètres, dont certaines peuvent aussi modéliser des réponses hormétiques. Si la fonction dose-effet a été ajustée par une analyse de la régression linéaire, il faudrait trouver un r^2 (coefficient de détermination) et/ou une pente appréciables avant d'estimer la CE_x en insérant une valeur correspondant à x % de la moyenne du témoin dans l'équation obtenue par l'analyse de la régression. Des limites de confiance à 95 % sont calculées selon la méthode de Fieller [mentionnée par Finney (18)] ou par une autre méthode récente appropriée.

49. Sinon, la réponse est modélisée comme un pourcentage ou une proportion du paramètre du modèle, paramètre qui est interprété comme le résultat moyen du témoin. Dans ce cas, la courbe sigmoïde normale (logistique, Weibull) peut souvent être facilement ajustée aux résultats à l'aide de la régression probit (18). Dans ce cas, la fonction de pondération doit être ajustée selon Christensen (33) pour les résultats métriques. Cependant, si on observe une hormèse, l'analyse probit doit être remplacée par une fonction logistique ou de Weibull à quatre paramètres, ajustée par une régression non linéaire (34). S'il est impossible d'ajuster une fonction dose-effet appropriée aux données, d'autres méthodes peuvent être utilisées pour estimer la CE_x et ses limites de confiance, telles que les moyennes mobiles d'après Thompson (19) et la méthode simplifiée de Spearman-Karber (20).

RAPPORT D'ESSAI

50. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

▼**M6**

Substance chimique d'essai:

— description bien fondée de la substance chimique d'essai, lot de fabrication, lot de conditionnement, numéro CAS, pureté;

— propriétés de la substance chimique d'essai (par exemple, log Koe, hydrosolubilité, pression de vapeur, constante de Henry (H) et données concernant son devenir et son comportement).

Organisme d'essai:

— animal d'expérience utilisé: espèce, nom scientifique, source et conditions d'élevage;

— âge, gamme de dimension (masse) des organismes d'expérience.

Conditions expérimentales:

— détails sur la préparation du sol d'essai;

— capacité maximale de rétention d'eau du sol;

— description de la méthode d'application de la substance chimique d'essai dans le sol;

— détails relatifs aux substances auxiliaires utilisées pour administrer la substance chimique d'essai;

— détails relatifs à l'étalonnage de l'appareil de pulvérisation, le cas échéant;

— description de la conception expérimentale et du mode opératoire;

— dimension des récipients expérimentaux et volume du sol d'essai;

— conditions expérimentales: intensité lumineuse, durée des cycles de lumière et d'obscurité, température;

— description du régime d'administration de la nourriture, nature et quantité de nourriture fournie au cours de l'essai, dates d'alimentation;

— pH et teneur en eau du sol au début et à la fin de l'essai.

Résultats de l'essai:

— mortalité adulte (%) dans chaque récipient expérimental, à la fin des quatre premières semaines de l'essai;

— masse totale des adultes au début de l'essai, dans chaque récipient expérimental;

— modification du poids corporel des adultes vivants (% du poids initial) dans chaque récipient expérimental, à l'issue des quatre premières semaines de l'essai;

— nombre de vers juvéniles produits dans chaque récipient expérimental à la fin de l'essai;

— description des effets évidents ou des symptômes pathologiques ou des changements nets de comportement;

— résultats obtenus avec la substance chimique de référence;

— CL_{50}, CSEO et/ou CE_x (par exemple CE_{50}, CE_{10}) pour la reproduction si certaines d'entre elles sont applicables avec des intervalles de confiance et représentation graphique du modèle ajusté utilisé pour leur calcul, toutes les informations et observations utiles à l'interprétation des résultats;

— courbe de la relation dose-effet;

— résultats obtenus avec chaque récipient.

Écarts par rapport aux procédures décrites dans la présente méthode d'essai et faits inhabituels survenus au cours de l'essai.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Jaenicke, J. (1982). «*Eisenia foetida*» is two biological species. Megadrilogica 4, 6-8.

(2) Oien, N and J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm — III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. Comp. Biochem. Physiol. 78c (2), 277 — 282.

▼**M6**

(3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida/Eisenia andrei* — comparison of two ringtests. In: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. Mitt. Biol. Bundesamst. f. Land- Forstwirtsch. Berlin-Dahlem, 320, p. 50-82.

(4) Chapitre C.8. de la présente annexe, Toxicité pour les vers de terre.

(5) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1996). Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction, №11268-2. ISO, Genève.

(6) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1993). Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) Partie 1: Détermination de la toxicité aiguë en utilisant des substrats de sol artificiel, №11268-1. ISO, Genève.

(7) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M. and Posthuma, L. (Eds). SETAC Press, 456 pages.

(8) EPA (1996). Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, avril 1996.

(9) Bouché, M.B. (1972). Lombriciens de France, Écologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.

(10) Edwards, C.A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714EN, Commission of European Communities.

(11) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach (eds.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.

(12) Edwards, C.A. and Bohlen, J.P. (1996). Biology and ecology of Earthworms, 3rd Edition. Chapman and Hall, London.

(13) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1994). Qualité du sol — Détermination du pH. n° 10390. ISO, Genève.

(14) Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

(15) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1992). Qualité du sol — Détermination de la caractéristique de la rétention en eau — Méthodes de laboratoire, №11274. ISO, Genève.

(16) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1993). Qualité du sol — Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau — Méthode gravimétrique, №11465. ISO, Genève.

(17) Römbke, J. and Moser, Th. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150+223 pp.

▼**M6**

(18) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

(19) Finney, D.J. (1978). Statistical method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.

(20) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

(21) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

(22) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

(23) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

(24) Dunnett, C.W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

(25) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361.

(26) Holm, S., (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

(27) Jonckheere, A.R. (1954). A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

(28) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

(29) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

(30) Williams, D.A. (1986). A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.

(31) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

(32) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485-1494.

(33) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

(34) Van Ewijk, P.H. and Hoekstra, J.A., (1993). (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

▼M6

Appendice 1

Définitions

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente méthode d'essai:

Substance chimique: une substance ou un mélange.

CE_x (concentration efficace à x %): concentration qui engendre un effet de x % sur les organismes d'expérience durant une période d'exposition déterminée, en comparaison avec un témoin. Par exemple, la CE_{50} est la concentration estimée causer un effet déterminé sur 50 % d'une population exposée durant une période définie. Dans cet essai, les concentrations efficaces sont exprimées en masse de substance chimique d'essai par masse sèche de sol expérimental ou en masse de substance chimique d'essai par unité de superficie du sol.

CL_0 (concentration non létale): désigne la concentration d'une substance chimique d'essai qui ne tue aucun des organismes d'expérience exposés durant une période déterminée. Dans cet essai, la CL_0 s'exprime en masse de substance chimique d'essai par masse sèche de sol expérimental.

CL_{50} (concentration létale moyenne): concentration d'une substance chimique d'essai qui entraîne la mort de 50 % des organismes d'expérience exposés durant une période déterminée. Dans cet essai, la CL_{50} s'exprime en masse de substance chimique d'essai par masse sèche de sol expérimental ou en masse de substance chimique d'essai par unité de superficie du sol.

CL_{100} (concentration totalement létale): concentration d'une substance chimique d'essai qui entraîne la mort de 100 % des organismes d'expérience exposés durant une période déterminée. Dans cet essai, la CL_{100} s'exprime en masse de substance chimique d'essai par masse sèche de sol expérimental.

CMEO (concentration minimale avec effet observé): désigne la plus faible concentration de la substance chimique d'essai qui exerce un effet statistiquement significatif ($p < 0,05$). Dans cet essai, la CMEO s'exprime en masse de substance chimique d'essai par masse sèche de sol expérimental ou en masse de substance chimique d'essai par unité de superficie du sol. Toutes les concentrations expérimentales supérieures à la CMEO doivent normalement produire un effet statistiquement différent du résultat observé sur le témoin. Tous les écarts à ce qui précède dans la détermination de la CMEO doivent être justifiés dans le rapport d'essai.

CSEO (concentration sans effet observé): désigne la plus haute concentration de la substance chimique d'essai directement inférieure à la CMEO et à laquelle aucun effet n'est observé. Dans cet essai, la CSEO n'a pas d'effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) durant une période d'exposition donnée, en comparaison avec le témoin.

Taux de reproduction: le taux de reproduction est le rapport du nombre moyen de vers juvéniles engendrés durant la période de l'essai par le nombre d'adultes.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼**M6**

Appendice 2

Détermination de la capacité maximale de rétention d'eau du sol

La méthode suivante pour déterminer la capacité maximale de rétention d'eau du sol a fait ses preuves. Elle est décrite à l'annexe C de la norme ISO DIS 11268-2 (1).

Prélevez une quantité déterminée (5 g, par exemple) du sol expérimental servant de substrat à l'aide d'un instrument approprié (tarière, etc.). Couvrez le fond de la tarière avec un morceau de papier filtre et, après l'avoir remplie d'eau, placez-la sur un support dans un bain d'eau. La tarière doit être progressivement submergée jusqu'à ce que le niveau d'eau dépasse le sommet de la carotte de sol. Laissez la tarière dans l'eau durant environ trois heures. Comme l'eau absorbée par les capillaires du sol ne peut pas être retenue en totalité, laissez l'échantillon de sol dégorger durant deux heures, en plaçant le tube sur un lit de sable quartzique fin très humide contenu dans un récipient fermé (pour empêcher le séchage). Pesez l'échantillon et séchez-le à 105 °C jusqu'à ce qu'il atteigne une masse constante. La capacité de rétention d'eau (CRE) se calcule comme suit:

$$\text{CRE (en \% de masse sèche)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

où:

S = masse du substrat saturé en eau + masse de la tarière + masse du papier filtre

T = tare (masse de la tarière + masse du papier filtre)

D = masse sèche du substrat

RÉFÉRENCE:

1). ISO (Organisation internationale de normalisation) (1996). Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction, N°11268-2. ISO, Genève.

▼**M6**

Appendice 3

Détermination du pH du sol

La méthode de détermination du pH d'un échantillon de sol, décrite ci-dessous, s'appuie sur la norme ISO 10390 (Qualité du sol — Détermination du pH) (1).

Laissez sécher une quantité définie de sol à température ambiante durant au moins 12 heures. Confectionnez une suspension du sol (contenant au moins 5 g de sol) dans cinq fois son volume soit d'une solution de chlorure de potassium (KCl) 1 M de qualité pour analyse, soit d'une solution de chlorure de calcium ($CaCl_2$) 0,01 M de qualité pour analyse. Agitez énergiquement la suspension durant cinq minutes. Laissez reposer la suspension durant au moins deux heures, mais pas plus de 24 heures. Mesurez le pH de la phase liquide à l'aide d'un pH-mètre, étalonné avant chaque mesure avec une série appropriée de solutions tampons (pH 4,0 et 7,0, par exemple).

RÉFÉRENCE:

1). ISO (Organisation internationale de normalisation) (1994). Qualité du sol — Détermination du pH. n° 10390. ISO, Genève.

▼**M6**

Appendice 4

Élevage d'eisenia fetida/Eisenia andrei

Il est préférable d'élever ces espèces dans un local climatisé à 20 °C ± 2 °C. À cette température et à condition d'être suffisamment nourris, les vers atteignent leur maturité au bout de 2 à 3 mois.

Ces deux espèces peuvent être élevées dans des déchets animaux très divers. Le milieu de culture recommandé est un mélange 50/50 de crottin de cheval ou de bouse de vache et de tourbe. Il faudra s'assurer que les vaches ou les chevaux dont on recueille les déjections ne font pas l'objet d'un traitement vétérinaire avec des substances telles que des activateurs de croissance, des nématicides ou des produits analogues, susceptibles d'être nocives pour les vers durant l'essai. Il est recommandé de récolter soi-même les déjections dans un élevage de l'agriculture biologique, l'expérience ayant démontré que les déjections vendues dans le commerce comme engrais de jardin risquent d'être nocives pour les vers. Le milieu devrait avoir un pH d'environ 6 à 7 (ajusté avec du carbonate de calcium), une faible conductivité ionique (une concentration de sels inférieure à 0,5 % ou à 6 mg) et ne devrait pas être trop contaminé par de l'ammoniac ou des urines animales. Le substrat doit être humide, mais pas engorgé. Des boîtes d'élevage d'une capacité de 10 à 50 litres conviennent.

Pour obtenir une population de vers homogène quant à l'âge et à la taille (masse), il vaut mieux commencer la culture avec des cocons. Une fois que la culture a été lancée, on la poursuit en transférant les vers adultes dans une boîte d'élevage garnie d'un substrat neuf et en les y laissant durant 14 à 28 jours pour leur permettre d'engendrer de nouveaux cocons. Les adultes sont ensuite enlevés et les juvéniles issus des cocons utilisés comme population de départ pour la prochaine culture. Les vers sont nourris en continu avec des déchets animaux et transférés de temps en temps dans un substrat neuf. On a constaté que les flocons d'avoine, du crottin de cheval ou de la bouse de vache séchés à l'air et finement broyés constituent une alimentation appropriée. Il faudra vérifier que les vaches ou les chevaux dont proviennent les déjections ne sont pas traités par des médicaments vétérinaires tels que des activateurs de croissance, susceptibles d'être nocifs pour les vers durant la culture à long terme. Les vers éclos des cocons sont utilisés dans l'essai dès qu'ils sont âgés de 2 à 12 mois et considérés comme adultes.

Les vers peuvent être considérés comme sains s'ils se déplacent dans le substrat, ne tentent pas de s'en échapper et se reproduisent continuellement. L'épuisement du substrat est révélé par le fait que les vers se déplacent très lentement et présentent une extrémité postérieure jaune. Dans ce cas, il est recommandé de renouveler le substrat et/ou de diminuer la densité de peuplement des boîtes.

▼M6

Appendice 5

Techniques de comptage des vers juvéniles éclos des cocons

Le tri manuel des vers présents dans le substrat exigeant un temps considérable, deux autres méthodes sont recommandées:

a) Les récipients expérimentaux sont déposés dans un bain d'eau, dont la température initiale de 40 °C est portée à 60 °C. Après une vingtaine de minutes, les vers juvéniles devraient apparaître à la surface du sol, d'où il est facile de les enlever et de les compter.

b) Le sol d'essai peut être rincé à travers un tamis selon la méthode mise au point par Van Gestel et al. (1), à condition que la tourbe et les déjections ou les flocons d'avoine ajoutés au sol aient été moulus en poudre fine. Deux tamis dont les mailles mesurent 0,5 mm (diamètre 30 cm) sont placés l'un au-dessus de l'autre. Le contenu du récipient expérimental est versé sur un tamis sous un puissant jet d'eau du robinet, de façon à retenir la majorité des jeunes vers et des cocons dans le tamis supérieur. Il importe de noter que toute la surface du tamis supérieur doit rester mouillée durant cette opération de façon que les vers juvéniles flottent sur un film d'eau, ce qui les empêche de se faufiler à travers les mailles du tamis. On obtient le meilleur résultat avec une pomme de douche.

Dès que la totalité du substrat est passée à travers le tamis, le tamis supérieur peut être rincé au-dessus d'un bol de façon à y recueillir les juvéniles et les cocons. On laisse reposer le contenu du bol jusqu'à ce que les cocons vides flottent à la surface et les cocons pleins ainsi que les juvéniles tombent au fond. Après quoi, l'eau du bol est vidée et les jeunes vers et les cocons sont transférés dans une boîte de Petri contenant un peu d'eau. On peut alors compter les vers en les enlevant à l'aide d'une aiguille ou d'une pince.

L'expérience a montré que la méthode a) convient mieux à l'extraction des vers juvéniles, susceptibles de passer à travers les mailles, même avec une ouverture de 0,5 mm.

L'efficacité de la méthode employée pour extraire les vers (et les cocons, le cas échéant) du sol devrait toujours être déterminée. Si les vers juvéniles sont enlevés par tri manuel, on conseille de répéter l'opération une fois sur tous les échantillons.

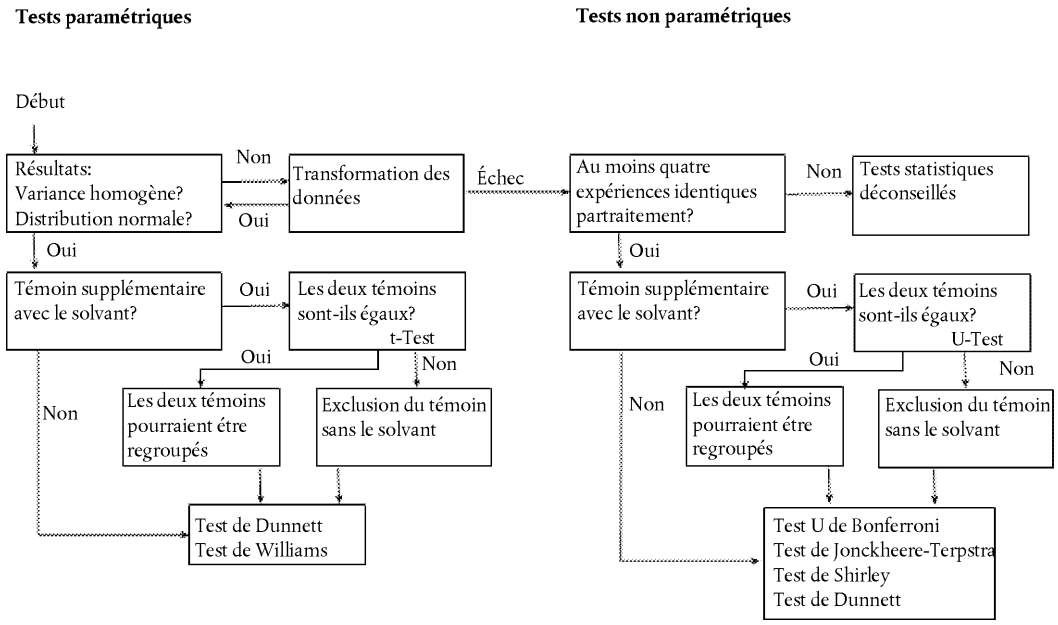
RÉFÉRENCE:

(1) Van Gestel, C.A.M., van Dis, W.A., van Breemen, E.M., Sparenburg, P.M. (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. Pedobiologia 32: 367-371.

▼M6

Appendice 6

Description schématique de l'évaluation statistique des résultats (détermination de la CSEO)



▼M6

C.34. DÉTERMINATION DE L'INHIBITION DE L'ACTIVITÉ DES BACTÉRIES ANAÉROBIES — RÉDUCTION DE LA PRODUCTION DE GAZ PAR UNE BOUE (D'EAUX USÉES) À DIGESTION ANAÉROBIE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 224 (2007) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les produits chimiques rejetés dans l'environnement aquatique traversent des zones aérobies et des zones anaérobies, dans lesquelles ils peuvent être dégradés et/ou ils peuvent inhiber l'activité bactérienne; dans certains cas, ils peuvent demeurer dans des zones anaérobies pendant des décennies ou des durées plus longues sans perturbation aucune. Lors du traitement des eaux usées, la première étape, la décantation primaire, est aérobie dans le liquide surnageant et anaérobie dans les boues sous-nageantes. Ensuite, l'étape secondaire fait intervenir une zone aérobie dans le bassin d'aération à boues activées et une zone anaérobie dans la boue sous-nageante dans le bassin de décantation secondaire. Les boues issues de ces deux étapes sont généralement soumises à un traitement anaérobie, et produisent alors du méthane et du dioxyde de carbone habituellement utilisés en production d'électricité. Dans les milieux moins confinés, les produits chimiques qui rejoignent les sédiments dans les baies, les estuaires et la mer ont toutes les chances de rester dans ces zones anaérobies indéfiniment s'ils ne sont pas biodégradables. Certaines propriétés physiques telles qu'une médiocre solubilité dans l'eau, une capacité d'adsorption élevée sur les solides en suspension, ou une inaptitude à la biodégradation aérobie permettront à quelques produits chimiques d'atteindre ces zones en proportions plus importantes.

2. Il est préférable que les produits chimiques rejetés dans l'environnement soient biodégradables en conditions anaérobies et aérobies, mais il est également essentiel qu'ils n'inhibent pas l'activité des microorganismes dans l'une ou l'autre zone. Au Royaume-Uni, quelques cas d'inhibition complète de la production de méthane due, par exemple, au pentacholorophénol présent dans les décharges industrielles, ont été signalés, qui ont engendré des frais considérables de transport des boues inhibées depuis les digesteurs vers des sites «sûrs» et d'importation de boue de digestion non contaminée en provenance d'installations proches. Il existe toutefois de nombreux cas d'interruption moins drastiques de la digestion par plusieurs autres produits chimiques, notamment des hydrocarbures aliphatiques halogénés (nettoyage à sec) et des détergents, qui nuisent gravement à l'efficacité des digesteurs.

3. Seule la méthode d'essai C.11 (1) traite de l'inhibition de l'activité bactérienne (Respiration de boues activées), et évalue l'effet de substances chimiques d'essais sur la vitesse d'absorption de l'oxygène en présence de substrat. La méthode a été largement utilisée en guise d'alerte précoce d'effets potentiellement nocifs de produits chimiques sur le traitement aérobie des eaux usées, ainsi que pour déterminer les concentrations non inhibitrices des substances chimiques d'essai susceptibles d'être utilisées dans les divers essais de biodégradabilité. La méthode d'essai C.43 (2) permet de déterminer dans une certaine mesure la toxicité d'une substance chimique d'essai sur la production de gaz par une boue anaérobie, diluée dix fois par rapport à sa concentration normale de solides afin d'obtenir la précision requise dans l'évaluation du pourcentage de biodégradation. Les boues diluées étant parfois plus sensibles aux substances inhibitrices, le groupe ISO a décidé de mettre au point une méthode employant une boue non diluée. Trois textes au moins ont été examinés (issus du Danemark, de l'Allemagne et du Royaume- Uni), pour aboutir finalement à la mise au point de deux normes ISO, l'une employant une boue non diluée, ISO 13 641-1 (3) et l'autre une boue diluée cent fois, ISO 13 641-2 (4), dans l'objectif de représenter les vases et les sédiments à faibles populations bactériennes. Les deux méthodes ont été soumises à un essai tournant (5); la première a été reconnue comme une norme acceptable, mais la seconde n'a pu faire l'objet d'un accord. Le Royaume-Uni a considéré que la proportion importante de participants signalant une production de gaz très faible ou nulle, en partie parce que la proportion de l'espace gazeux était trop élevée (75 %) pour une sensibilité optimale, appelait à un nouvel examen de la méthode.

4. Des travaux préalables menés au Royaume-Uni (6)(7) font état d'une méthode manométrique sur boue de digestion non diluée additionnée de boue d'eaux usées à titre de substrat, dans des récipients de 500 ml; l'appareil était encombrant et l'odeur de la boue brute nauséabonde. Par la suite, l'appareil plus compact et plus pratique de Shelton et Tiedje (8), amélioré par Battersby et Wilson (9) a été exploité avec succès par Wilson et al. (10).

▼M6

Kawahara et al (11) sont parvenus à préparer des boues plus homogènes au laboratoire, pour les utiliser dans des essais de biodégradabilité anaérobie et d'inhibition sur plusieurs produits chimiques. De surcroît, le substrat de boue brute a été remplacé afin de procéder à l'essai avec une boue anaérobie diluée cent fois ou avec des vases, des sédiments, etc., à faible activité bactérienne.

5. Cette méthode permet d'obtenir des informations utiles pour prédire l'effet probable d'une substance chimique d'essai sur la production de gaz dans des digesteurs anaérobies. Toutefois, seuls des essais plus longs qui simulent plus rigoureusement le fonctionnement de digesteurs sont capables d'indiquer si les microorganismes peuvent s'adapter à la substance chimique d'essai ou si ces substances susceptibles d'être absorbées ou adsorbées sur les boues peuvent s'accumuler jusqu'à atteindre une concentration toxique, sur une période plus longue que celle testée dans cet essai.

PRINCIPE DE L'ESSAI

6. Des fractions aliquotes d'un mélange de boue à digestion anaérobie (20 g/l à 40 g/l de matières solides totales) et d'une solution de substrat dégradable sont incubées seules et, en parallèle, avec la substance chimique d'essai en quantités comprises dans un intervalle de concentrations, dans des récipients scellés, pendant une durée pouvant atteindre trois jours. La quantité de gaz produits (méthane plus dioxyde de carbone) est mesurée par l'augmentation de la pression (Pa) dans les flacons. Les pourcentages d'inhibition de la production de gaz attribuables aux diverses concentrations de la substance chimique d'essai sont calculés à partir des quantités produites dans les flacons d'essai et témoins respectifs. La CE_{50} et d'autres concentrations efficaces sont calculées à partir des courbes du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des substances chimiques d'essai, ou, le plus souvent, de son logarithme.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE CHIMIQUE D'ESSAI

7. Les substances chimiques d'essai sont habituellement utilisées sous la forme la plus pure facilement accessible, car les impuretés contenues dans certaines substances chimiques, par exemple, les cholorophénols, sont parfois plus toxiques que la substance d'essai elle-même. Il peut toutefois se révéler utile de tester les substances chimiques sous la forme dans laquelle elles sont produites ou commercialisées. L'utilisation en routine de produits formulés est déconseillée, mais convient parfois pour les substances chimiques d'essais de solubilité médiocre. Il convient de connaître les propriétés suivantes de la substance chimique d'essai: solubilité dans l'eau et dans certains solvants organiques, pression de vapeur, coefficient d'adsorption, hydrolyse et biodégradabilité en conditions anaérobies.

CHAMP D'APPLICATION DE LA METHODE

8. Cet essai s'applique à des substances solubles ou insolubles dans l'eau, y compris les substances volatiles. Toutefois, des précautions particulières sont indispensables avec les matériaux à faible solubilité dans l'eau [voir réf. (12)] et à volatilité élevée. Il est également possible d'utiliser des inoculums provenant d'autres sites anaérobies, par exemple, vases, sols saturés et sédiments. Les systèmes bactériens anaérobies préalablement exposés à des substances toxiques peuvent être adaptés de façon à ce que leur activité soit maintenue en présence de produits chimiques xénobiotiques. Les inoculums issus de systèmes bactériens adaptés font parfois preuve d'une tolérance plus élevée aux substances chimiques d'essais que des inoculums obtenus à partir de systèmes non adaptés.

SUBSTANCES CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE

9. Pour vérifier le mode opératoire, on teste une substance chimique de référence parallèlement à la substance d'essai dans des récipients appropriés en suivant le même protocole; le 3,5-dichlorophénol s'est révélé un inhibiteur type de la production de gaz anaérobie, ainsi que de la consommation d'oxygène par les boues activées et d'autres réactions biochimiques. Deux autres produits chimiques présentent une capacité d'inhibition plus élevée que celle du 3,5-dichlorophénol sur la production de méthane, le bis-thiocyanate de méthylène et le pentachlorophénol, mais les résultats les concernant n'ont pas encore été validés. Le pentachlorophénol n'est pas recommandé, car il est difficile à obtenir sous forme pure.

▼M6

REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS

10. Dans un essai tournant international (5), une reproductibilité seulement moyenne a été relevée entre les valeurs de CE_{50} de 10 laboratoires participants pour le 3,5-dichlorophénol et d'acide 2-bromo- éthane-sulfonique (l'intervalle pour le premier allait de 32 mg/l à 502 mg/l et pour le second de 220-2 190 mg/l.)

Nombre de laboratoires	En mg/l			En mg/g de boue		
	moyenne	e.t.	cv(%)	moyenne	e.t.	cv(%)
	3, 5-Dichlorophénol					
10	153	158	103	5	4,6	92
	Acide 2-bromo-éthane-sulfonique					
10	1 058	896	85	34	26	76

Données CE_{50} de l'essai tournant — boue non diluée

11. Les coefficients de variations élevés entre les laboratoires s'expliquent dans une large mesure par des différences de sensibilité des microorganismes des boues qui ont été ou non préalablement exposés à la substance chimique d'essai ou à d'autres substances de même nature chimique. La précision de la détermination de la valeur de CE_{50} en fonction de la concentration de boue était à peine meilleure que celle de la valeur «volumétrique» (mg/l). Dans les trois laboratoires ayant indiqué la précision de leur valeur de CE_{50} pour le 3,5-dichlorophénol, les coefficients de variation étaient nettement inférieurs (22, 9 et 18 % respectivement pour la CE_{50} en mg/g) que ceux des moyennes des dix laboratoires réunies. Les moyennes individuelles des trois laboratoires s'élevaient à 3,1; 3,2 et 2,8 mg/g, respectivement. Les coefficients de variation plus faibles et acceptables au sein d'un même laboratoire, comparés aux coefficients beaucoup plus élevés entre les valeurs des laboratoires, c'est-à-dire 9-22 % cf. 92 %, révèlent des différences significatives entre les propriétés des boues individuelles.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

12. L'utilisation de matériel courant de laboratoire et des équipement suivants est requise:

a) Incubateur — anti-étincelles et thermostaté à 35 °C ± 2 °C;

b) Récipients expérimentaux en verre résistant à la pression d'une capacité1 nominale appropriée ([1]), munis d'un septum étanche au gaz, capable de supporter une pression d'environ 2 bars ou 2×10^5 Pa (le revêtement utilisé sera, par exemple du PTFE = polytétrafluoréthylène). L'utilisation de flacons à sérum en verre d'un volume nominal de 125 ml, et d'un volume réel d'environ 160 ml, obturé par des septum ([2]) adaptés aux flacons à sérum et des capsules en aluminium serties est recommandée; il est également possible d'utiliser des flacons d'un volume total compris entre 0.1 et 1 litre;

([1]) La capacité préconisée est comprise entre 0,1 et 1 litre.

([2]) Il est recommandé d'utiliser des septums en silicone étanche au gaz et de vérifier l'étanchéité au gaz des bouchons, en particulier les septums en caoutchouc butylique, car plusieurs types de septum vendus dans le commerce ne sont pas suffisamment étanches au méthane et certains ne sont plus étanches une fois qu'ils ont été percés par une aiguille dans les conditions de l'essai.

— Les septums revêtus étanches au gaz sont recommandés et doivent être utilisés pour les substances volatiles (certains septum du commerce sont relativement minces, d'une épaisseur inférieure à 0,5 cm, et ne sont plus étanches après avoir été percés par une aiguille de seringue).

— Les septums en caoutchouc butylique (environ 1 cm) sont recommandés, si les substances d'essai ne sont pas volatiles (ils sont normalement toujours étanches au gaz après avoir été percés).

— Il est conseillé de vérifier soigneusement avant le test que les septum restent étanches au gaz après avoir été percés.

▼M6

c) Manomètre de précision (1) et aiguilles fixées

La production totale de gaz (méthane plus dioxyde de carbone) est mesurée à l'aide d'un manomètre capable de mesurer et d'évacuer les gaz produits, par exemple, un manomètre de précision manuel relié à une aiguille de seringue; un robinet à trois voies étanche aux gaz permet la libération de la pression excédentaire (Appendice 1). Le volume interne des tuyaux et du robinet du transducteur de pression doit être aussi faible que possible, de telle sorte que les erreurs introduites en négligeant le volume de l'appareillage restent insignifiantes;

d) Récipients isolés, pour le transport des boues de digestion;

e) Robinets à pression trois voies;

f) Tamis, avec une ouverture de maille de 1 mm;

g) Réservoir, pour la boue de digestion, flacon en verre ou en polyéthylène haute densité, d'un volume d'environ 5 litres, muni d'un agitateur et d'un dispositif permettant le passage d'un courant d'azote gazeux (voir paragraphe 13) dans l'espace libre;

h) filtres membranaires (0,2 μm) pour stériliser le substrat;

i) micro-seringues, pour la connexion étanche au gaz du transducteur de pression [voir paragraphe 12(c)] à l'espace libre des bouteilles [voir paragraphe 12(b)]; elles servent également à ajouter les matériaux d'essai liquides dans les flacons;

j) boîte à gants, en option, mais recommandée, avec une pression d'azote légèrement positive.

Réactifs

13. Des réactifs de qualité analytique sont utilisés dans tout l'essai. Il faut toujours utiliser de l'azote gazeux très pur avec une concentration d'oxygène inférieure à 5 μM.

Eau

14. Si une dilution s'avère nécessaire à quelque étape que ce soit, il convient d'utiliser de l'eau désionisée préalablement désaérée. Il n'est pas indispensable de contrôler analytiquement cette eau, mais plutôt de s'assurer que l'appareil de désionisation est régulièrement entretenu. Les solutions mères doivent également être préparées avec de l'eau désionisée. On s'assurera que toutes les solutions ou les dilutions du matériel d'essai sont exemptes d'oxygène avant d'y ajouter l'inoculum anaérobie. Cette absence peut se vérifier par soufflage d'azote gazeux dans l'eau de dilution (ou dans les dilutions) une heure avant l'addition de l'inoculum, ou bien en chauffant l'eau de dilution jusqu'à son point d'ébullition et en la refroidissant à température ambiante dans une atmosphère sans oxygène.

Boue digérée

15. Les boues de digestion activées sont prélevées dans un digesteur de station d'épuration d'eaux usées, ou bien dans un digesteur de laboratoire, affecté au traitement de boues principalement dérivées d'eaux usées domestiques. Les informations pratiques concernant les boues de digesteurs de laboratoire sont disponibles dans d'autres références (11). S'il est prévu d'utiliser un inoculum adapté, il faudra peut- être envisager de prélever une boue de digestion dans une station d'épuration d'effluents industriels. Pour récolter ces boues, il est préférable d'utiliser des flacons à large ouverture en polyéthylène haute densité ou un matériau similaire, capables de se dilater.

(1) Le manomètre doit être utilisé et étalonné régulièrement, conformément aux instructions du fabricant. Si l'on utilise un manomètre de la qualité prescrite, par exemple encapsulé avec une membrane en acier, il n'est pas nécessaire de l'étalonner au laboratoire, mais cette opération sera effectuée par un institut autorisé aux intervalles recommandés. L'exactitude de l'étalonnage peut être vérifiée au laboratoire par une mesure unique à 1×10^5 Pa sur un manomètre à affichage mécanique. Une mesure correcte de ce point assure que la linéarité n'a pas non plus changée. Lorsque l'on utilise d'autres dispositifs de mesure (sans étalonnage certifié par le fabricant), il est recommandé de procéder à une reconversion sur l'intervalle total à intervalles réguliers (Appendice 2).

▼M6

Remplir ces flacons de boue jusqu'à environ 1 cm de leur embouchure et les fermer hermétiquement, de préférence avec une soupape de sécurité [paragraphe 12 (e)], et les placer dans des réceptacles isolés [paragraphe 12 (d)] pour réduire au minium le choc thermique, jusqu'à leur transfert dans un incubateur maintenu à 35 °C ± 2 °C. A l'ouverture des flacons, prendre soin de relâcher la pression de gaz en excès en ouvrant avec précaution le bouchon, ou grâce au robinet de libération de la pression trois voies (paragraphe 12 (e)). Il est préférable d'utiliser la boue dans les quelques heures qui suivent sa récolte ou bien de la conserver à 35 °C ± 2 °C sous un espace libre rempli d'azote pendant une durée inférieure à 3 jours, dans le cas où la perte d'activité normale est faible.

Avertissement — Les boues de digestion présentent des risques d'incendie ou d'explosion à cause des gaz inflammables qu'elles dégagent: elles renferment également des organismes potentiellement pathogènes, de sorte que ces boues sont à manipuler avec prudence. Pour des raisons de sécurité, il n'est pas conseillé de recueillir les boues dans des récipients en verre.

Inoculum

16. Immédiatement avant son utilisation, mélanger la boue par agitation douce et la faire passer sur un tamis à mailles de 1 mm^2 [paragraphe 12(f)] avant de l'introduire dans un flacon approprié [paragraphe 12(g)] en la faisant traverser l'espace vide balayé par un courant d'azote. Prélever un échantillon pour la mesure de la concentration des matières solides sèches totales (voir, par exemple, la norme ISO 11 923 (13) ou la norme UE équivalente). En général, la boue est utilisée sans dilution. La concentration de solides est généralement comprise entre 2 % et 4 % (p/v). Contrôler la valeur du pH de la boue et l'ajuster, s'il y a lieu, à 7 ± 0.5.

Substrat d'essai

17. Dissoudre 10 g de bouillon nutritif (par exemple Oxoid), 10 g d'extrait de levure et 10 g de D-glucose dans de l'eau désionisée et diluer à 100 ml. Stériliser par filtration sur un filtre membranaire de 0,2 µm [paragraphe 12 (h)] et utiliser immédiatement ou conserver à 4 °C pendant 1 jour au maximum.

Substance chimique d'essai

18. Préparer une solution mère séparée de chaque substance chimique d'essai hydrosoluble de sorte qu'elle contienne, par exemple, 10 g/l de la substance dans de l'eau de dilution sans oxygène (paragraphe 14). Utiliser des volumes appropriés de ces solutions mères pour préparer des mélanges réactionnels de concentrations croissantes. Il est également possible de préparer des dilutions en série de chaque solution mère afin d'ajouter un volume identique dans chaque flacon d'essai pour chaque concentration finale requise. Le pH des solutions mères est ajusté à 7 ± 0.2, s'il y a lieu.

19. Pour les substances chimiques d'essai insuffisamment solubles dans l'eau, se reporter à la norme ISO 10 634 (12) ou à la norme UE équivalente. Lorsqu'il faut utiliser un solvant organique, il convient d'éviter l'emploi de solvants tels que le chloroforme, et le tétrachlorure de carbone dont le puissant effet d'inhibition de la production de méthane est notoire. Préparer une solution de concentration appropriée de substance insoluble dans l'eau dans un solvant volatil adapté, par exemple, l'acétone ou l'éther diéthylique. Ajouter des volumes nécessaires de solution de solvant aux flacons d'essai vides (paragraphe 12(b)) et évaporer le solvant avant l'addition de la boue. Pour d'autres traitements, consulter la norme ISO 10 634 (12) ou la norme UE équivalente en gardant à l'esprit que tout tensioactif utilisé pour produire des émulsions peut inhiber la production de gaz anaérobie. Si l'on estime que la présence de solvants organiques et d'agents émulsifiants est susceptible d'engendrer des artefacts, la substance chimique d'essai peut être directement ajoutée au mélange d'essai sous forme d'une poudre ou d'un liquide. Il est possible d'injecter les substances volatiles et les substances chimiques d'essai liquides insolubles dans l'eau dans les flacons de sérum inoculé à l'aide de micro-seringues [paragraphe 12(i)].

▼M6

20. Ajouter les substances chimiques d'essai aux flacons afin d'obtenir une série géométrique de concentrations, par exemple, 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l, et 15,6 mg/l. Lorsque l'intervalle de toxicité n'est pas prévisible en se basant sur des substances similaires, il convient de réaliser tout d'abord un essai préliminaire de détermination de l'intervalle de toxicité approprié sur des concentrations de 1 000 mg/l, 100 mg/l et 10 mg/l.

Substance chimique de référence

21. Préparer une solution aqueuse de 3,5-dichlorophénol (10 g/l) en ajoutant progressivement la quantité minimale de 5 mol/l de solution d'hydroxyde de sodium au solide, sous agitation, jusqu'à dissolution. Ajouter ensuite de l'eau de dilution désoxygénée (paragraphe 14) pour ajuster le volume requis; une sonication peut favoriser la dissolution. D'autres substances de référence peuvent être utilisées lorsque l'intervalle moyen de la CE_{50} a été obtenu dans au moins trois tests employant des inoculums différents (sources différentes ou dates de récolte différentes).

INTERFÉRENCE/ERREURS

22. Il est vraisemblable que certains des constituants de la boue réagissent avec des inhibiteurs potentiels, ce qui annulera leurs effets sur les micro-organismes, avec pour résultat une inhibition plus faible, voir nulle. En outre, si la boue contient déjà une substance inhibitrice, l'essai avec la substance donnera des résultats erronés. Ces exemples, et de nombreux autres facteurs identifiés, peuvent produire de faux résultats. Ils sont indiqués dans l'Appendice 3, conjointement à des méthodes permettant d'éliminer ou au moins de réduire les erreurs.

MODE OPÉRATOIRE

23. Le nombre de répétitions requis dépend du degré de précision exigé pour les indices d'inhibition. Si les bouchons des flacons sont suffisamment étanches aux gaz pendant la durée du test, ne préparer qu'un seul lot (au moins trois répétitions) de flacons d'essai à chaque concentration requise. En parallèle, préparer un lot de flacons avec la substance chimique de référence et un ensemble de témoins. Toutefois, lorsque la fiabilité des bouchons des flacons n'est assurée que pour une ou quelques percées, préparer un lot (par exemple trois répétitions) des flacons d'essai pour chaque intervalle de temps (t) auquel sont requis les résultats à toutes les concentrations d'une substance chimique chimique d'essai. Parallèlement, préparer des lots 't' de flacons équivalents pour la substance chimique de référence et les témoins.

24. L'utilisation d'une boîte à gants [paragraphe 12 j)] est recommandée. Au moins 30 minutes avant le début de l'essai, faire passer un courant d'azote à travers la boîte à gants contenant tout l'équipement nécessaire. S'assurer que la température de la boîte est 35 °C ± 2 °C pendant la manipulation et la fermeture hermétique des flacons.

Essai préliminaire

25. Lorsque l'activité de la boue est inconnue, il est recommandé de procéder à un essai préliminaire. Préparer des témoins dont les concentrations de matières solides s'élèvent à 10 g/l, 20 g/l et 40 g/l, par exemple, additionnés de substrat, mais sans substance d'essai. Utiliser également différents volumes de mélange réactionnel afin de disposer de trois ou quatre rapports entre volume d'espace libre et volume de liquide. On choisira parmi les résultats de volumes de gaz produits à divers intervalles de temps les conditions les mieux appropriées à l'obtention de deux mesures quotidiennes caractérisées par des volumes significatifs de gaz et une libération de pression par jour avec une sensibilité optimale ([1]) sans risque d'explosion.

Addition des substances chimiques d'essai

26. Ajouter les substances chimiques d'essai hydrosolubles aux flacons d'essai vides [paragraphe 12(b)] sous forme de solutions aqueuses (paragraphe 18). Utiliser des lots de flacons comportant au moins trois répétitions pour chaque concentration de l'intervalle (paragraphe 20). Lorsque les substances chimiques d'essai sont insolubles ou médiocrement solubles, les injecter en

([1]) Ceci s'applique au modèle expérimental et aux conditions expérimentales dans lesquels les volumes de gaz produits — par les témoins à blanc et les récipients indiquant une inhibition de 70-80 % — peuvent être estimés avec des marges d'erreurs acceptables.

▼M6

solution dans des solvants organiques à l'aide d'une micro-seringue dans les flacons vides pour préparer des lots de répétition des cinq concentrations de substance d'essai. Evaporer le solvant par purge à l'aide d'un jet d'azote gazeux sur la surface des solutions dans les flacons d'essai. Il est également possible d'ajouter des quantités pesées des produits chimiques insolubles solides directement dans les flacons d'essai.

27. Les substances chimiques d'essai liquides insolubles et médiocrement solubles dans l'eau ajoutées sans solvant sont introduites directement par une micro-seringue dans les flacons d'essai après addition de l'inoculum et du substrat d'essai (voir paragraphe 30). Cette technique peut également s'appliquer aux substances d'essai volatiles.

Addition d'inoculum et de substrat

28. Agiter un volume approprié de boue de digestion tamisée (voir paragraphe 16) dans un flacon de 5 litres [paragraphe 12 (g)], en faisant passer un courant d'azote dans l'espace vide. Purger les flacons d'essai, qui contiennent les solutions aqueuses ou les solutions dans un solvant évaporé de substances d'essai, avec un courant d'azote, pendant environ 2 minutes pour éliminer l'air. Répartir des fractions aliquotes, par exemple de 100 ml, de boue bien mélangée dans les flacons d'essai à l'aide d'une pipette à grande pointe ou d'une éprouvette graduée. Il est essentiel de remplir la pipette en une seule fois jusqu'au volume exact de boue nécessaire, car les matières solides de la boue sédimentent facilement. Dans le cas d'un prélèvement trop important, vider la pipette et recommencer.

29. Ajouter ensuite une quantité suffisante de solution de substrat (paragraphe 17) pour ajuster à 2 g /l la concentration dans le mélange de chacun des composants suivants: bouillon nutritif, extrait de levure et D-glucose, tout en poursuivant la purge à l'azote. Le tableau suivant présente un exemple de lots d'essai

Concentration finale en masse de la substance chimique d'essai dans les flacons d'essai (mg/l)	Volume de substance chimique d'essai (ml)		Réactifs et milieux (ml)		
	Solution stock a) 10 g/l para. 18	Solution stock b) 1 g/l para. 18	Dilution dans l'eau para. 14	Inoculum para. 16	Substrat para. 17
0	—	0	1,0	100	2
1	—	0,1	0,9	100	2
3,3	—	0,33	0,67	100	2
10	0,1	—	0,9	100	2
33	0,33	—	0,67	100	2
100	1,0	—	0	100	2

Volume total du flacon = 160 ml. Volume de liquide = 103 ml
Volume de gaz = 57 ml, soit 35,6 % du volume total.

30. Purger à l'azote de la même manière un nombre suffisant de flacons d'essai vides pour éliminer tout produit volatil et substance chimique d'essai liquide insoluble (voir paragraphe 27).

▼M6

Témoins et substance chimique de référence

31. Préparer des lots comportant au moins trois répétitions contenant seulement la boue et le substrat, en guise de témoins. Préparer également des flacons en deux exemplaires contenant de la boue et du substrat additionnés d'une quantité suffisante de solution mère de la substance chimique de référence, le 3,5- dichlorophénol (paragraphe 21) pour ajuster la concentration finale à 150 mg/l. Cette concentration devrait inhiber la production de gaz d'environ 50 %. Il est également possible de préparer la substance de référence à plusieurs concentrations couvrant un intervalle. Trois flacons supplémentaires serviront à la mesure du pH, et contiendront la boue, de l'eau désoxygénée et le substrat. Ajouter la substance chimique d'essai à deux flacons à la concentration la plus élevée de l'essai et ajouter de l'eau désoxygénée aux deux autres flacons.

32. Il convient de s'assurer que toutes les flacons, d'essai, de substances de référence et témoins, contiennent le même volume (V_R) de liquide; s'il y a lieu, ajouter de l'eau désionisée désoxygénée (paragraphe 14) pour ajuster le volume. L'espace libre doit représenter entre 10 % et 40 % du volume du flacon et sa valeur exacte est choisie en se fondant sur les données obtenues dans l'essai préliminaire. Après introduction de tous les constituants dans les flacons, retirer l'aiguille d'alimentation en gaz et fermer hermétiquement chaque flacon avec un bouchon de caoutchouc et une capsule d'aluminium (paragraphe 12 (b)) en humidifiant le bouchon avec une goutte d'eau désionisée pour faciliter son insertion. Mélanger le contenu de chaque flacon par agitation.

Incubation des flacons

33. Transférer les flacons dans l'incubateur thermostaté, muni de préférence d'un dispositif d'agitation et maintenu à 35 °C ± 2 °C. Les flacons sont incubés à l'obscurité. Au bout d'environ 1 heure, équilibrer la pression dans les flacons avec la pression atmosphérique en insérant l'aiguille de seringue, reliée au manomètre (paragraphe 12(c)), à travers le bouchon de chaque flacon, ouvrir le robinet jusqu'à ce que le manomètre affiche zéro, puis fermer le robinet. Il convient d'insérer l'aiguille à un angle d'environ 45° pour éviter la fuite du gaz contenu dans les flacons. Si les flacons incubés sont dépourvus de dispositif d'agitation, les agiter manuellement deux fois par jour pendant toute la période d'incubation afin d'équilibrer le système. Incuber les flacons en position inversée pour éviter la perte de gaz à travers le septum. Toutefois, l'inversion est déconseillée dans le cas où des substances chimiques d'essai insolubles sont susceptibles d'adhérer au fond du flacon.

Mesures de pression

34. Lorsque la température de tous les flacons a atteint 35 °C ± 2 °C, mesurer et noter le pH du contenu de deux des quatre flacons préparés à cette fin et en jeter le contenu. Poursuivre l'incubation des flacons restants à l'obscurité. Mesurer et noter la pression dans les flacons deux fois par jour pendant les 48 à 72 heures suivantes en insérant l'aiguille du manomètre à travers le bouchon de chaque flacon, tout à tour, et en séchant l'aiguille entre chaque mesure. Maintenir toutes les parties du flacon à la température d'incubation pendant la mesure, qui doit être réalisée aussi rapidement que possible. Noter la pression après stabilisation de la mesure. Ouvrir ensuite la soupape de ventilation et la refermer lorsque la valeur de la pression est revenue à zéro. L'essai dure habituellement 48 heures à partir de la première égalisation de la pression, désignée par «temps 0». Dans le cas de substances chimiques volatiles, le nombre de mesures et de ventilations doit être réduit à un (à la fin de l'incubation) ou deux pour limiter au minimum la perte de substance d'essai (10).

35. Si la mesure de pression donne un résultat négatif, il ne faut pas ouvrir la soupape. Il arrive que de l'humidité s'accumule dans l'aiguille et le tube de la seringue, ce qui se traduit par une valeur de pression faiblement négative. Dans ce cas, retirer la seringue, secouer le tube, le sécher avec un mouchoir en papier et monter une aiguille neuve.

Mesure du pH

36. Mesurer et enregistrer le pH du contenu de chaque flacon après la mesure de pression finale.

▼M6

RÉSULTATS ET RAPPORT

Expression des résultats

37. La somme et la moyenne des pressions enregistrées sont calculées à chaque intervalle de temps pour chaque ensemble de flacons de répétition et la pression de gaz globale cumulée moyenne est calculée à chaque intervalle de temps pour chaque lot de répétitions. Tracer les courbes de production de gaz cumulée moyenne (Pa) en fonction du temps pour les flacons témoins, d'essai et de référence. Choisir un point temporel dans la partie linéaire de la courbe, généralement 48 heures, et calculer le pourcentage d'inhibition (1) pour chaque concentration par l'équation [1]:

$$I = (1 - P_t/P_C) \times 100 \quad [1],$$

où

I pourcentage d'inhibition;

P_t pression gazeuse produite avec le matériau d'essai à un instant donné, en Pascal (Pa);

P_c pression gazeuse produite dans le flacon témoin au même instant, en Pascal (Pa).

II est conseillé de tracer deux courbes, la courbe I en fonction de la concentration, et une autre courbe en fonction du logarithme de la concentration, de façon à choisir la courbe la plus proche de la linéarité. La valeur de CE_{50} (mg/l) est évaluée visuellement ou par analyse de régression à partir de la courbe la plus proche de la linéarité. A des fins de comparaison, il peut être utile d'exprimer la concentration de la substance en mg de substance/g de matières solides sèches totales. Pour obtenir cette concentration, il suffit de diviser la concentration volumique (mg/l) par la concentration volumique des matières solides de la boue sèche (g/l) (paragraphe 16).

38. Calculer le pourcentage d'inhibition obtenu par l'unique concentration de la substance chimique de référence utilisée, ou bien la CE_{50} lorsqu'un nombre suffisant de concentrations a été analysé.

39. Convertir la pression moyenne du gaz produit dans le flacon témoin P_c (Pa) en volume en se reportant à la courbe d'étalonnage du manomètre (Appendice 2) et de calculer ainsi le rendement en gaz, exprimé en volume produit en 48 heures par 100 ml de boue non diluée à une concentration de matières solides de 2 % (20 g/l) à 4 % (40 g/l).

Critères de validité

40. Les résultats issus de l'essai ISO inter-laboratoires (5) montrent que la substance chimique de référence (3,5-dichlorophénol) provoque une inhibition de 50 % de la production de gaz dans un intervalle de concentrations allant de 32 mg/l à 510 mg/l, avec une moyenne de 153 mg/l (paragraphe 10). L'ampleur de cet intervalle ne permet pas d'établir des limites précises utilisables comme critères de validité, qui ne seront disponibles que lorsqu'auront été mises au point des techniques de production d'inoculums moins variables. Les volumes de gaz produits dans les flacons témoins en 48 heures étaient compris entre 21 ml/g de matières sèches de boue et 149 ml/g (moyenne 72 ml/g). Aucune relation évidente n'a pu être établie entre le volume de gaz produit et la valeur de CE_{50} correspondante. Le pH final variait entre 6,1 et 7,5.

41. La validité de l'essai est reconnue si une inhibition supérieure à 20 % est obtenue dans le témoin de référence contenant 150 mg/l de 3,5-dichlorophénol, si plus de 50 ml de gaz par g de matières sèches sont produits dans le témoin à blanc et si la valeur du pH est comprise dans l'intervalle de 6,2 à 7,5 à la fin de l'essai.

Rapport d'essai

42. Le rapport d'essai doit inclure les informations suivantes:

Substance chimique d'essai

— nom courant, nom chimique, numéro CAS, formule structurale et propriétés physicochimiques pertinentes;

▼M6

— pureté (impuretés) de la substance chimique d'essai.

Conditions expérimentales:

— volumes des contenus liquides et de l'espace vide dans les récipients d'essai;

— description des récipients d'essai et de l'appareil de mesure des gaz (par exemple, type de manomètre);

— ajout de la substance chimique d'essai et de la substance chimique de référence au système expérimental, concentrations expérimentales utilisées et recours à un solvant, le cas échéant;

— détails sur l'inoculum utilisé: nom de la station d'épuration des eaux usées, description de la source des eaux usées traitées (par exemple, température de fonctionnement, temps de rétention de la boue, origine principalement domestique ou déchets industriels, etc.), concentration de matières solides, activité de production gazeuse du digesteur anaérobie, exposition préalable ou préadaptation éventuelle à des substances toxiques ou site de récolte de vase, de sédiments etc;

— température d'incubation et intervalle;

— nombre de répétitions.

Résultats:

— valeurs de pH à la fin de l'essai;

— toutes les valeurs mesurées dans les récipients d'essai, les témoins à blanc, les témoins contenant la substance chimique de référence, le cas échéant, (par exemple pression en Pa ou en millibars) sous forme de tableau;

— pourcentage d'inhibition dans les flacons d'essai et de référence et courbes d'inhibition en fonction de la concentration;

— calcul des valeurs de CE_{50}, exprimées en mg/l et en mg/g;

— production de gaz par gramme de boue en 48 heures;

— motifs d'un rejet éventuel des résultats de l'essai;

— discussion des résultats, en particulier mention de tous les écarts par rapport aux modes opératoires présentés dans cette méthode d'essai et discussion de tous les écarts observés dans les résultats d'essais dus à des interférences et à des erreurs par rapport aux résultats escomptés;

— objectifs de l'essai: définir si l'essai était destiné à mesurer la toxicité de micro-organismes préalablement exposés ou non.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Chapitre C.11 de la présente annexe: Boues activées, essai d'inhibition de la respiration.

(2) Chapitre C.43 de la présente annexe: Essai de biodégradabilité anaérobie des composés organiques dans une boue digérée: mesure du dégagement gazeux.

(3) Organisation internationale de normalisation (2003) ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1: General Test.

(4) Organisation internationale de normalisation (2003) ISO 13 641-2 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 2: Test for low biomass concentrations.

(5) ISO (2000) Ring test of ISO 13 641-1 and ISO 13 641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans MR, Painter HA. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.

▼**M6**

(6) Swanwick JD, Foulkes M (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. Wat. Pollut. Control, 70, 58-70.

(7) HMSO (1986) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, In: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.

(8) Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Env. Microbiol. 47 850-857.

(9) Battersby NS and Wilson V (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. Chemosphere 17, 2441-2460.

(10) Wilson V, Painter HA and Battersby NS (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. Proc. Int. Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods, GSF Forschungzentrum, Neuherberg, Germany (1990). Eds. Steinberg C and Kettrup A, pp117-132 (1992).

(11) Kawahara K, Yakabe Y, Chida T, and Kida K (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. Chemosphere, 39 (12), 2007-2018.

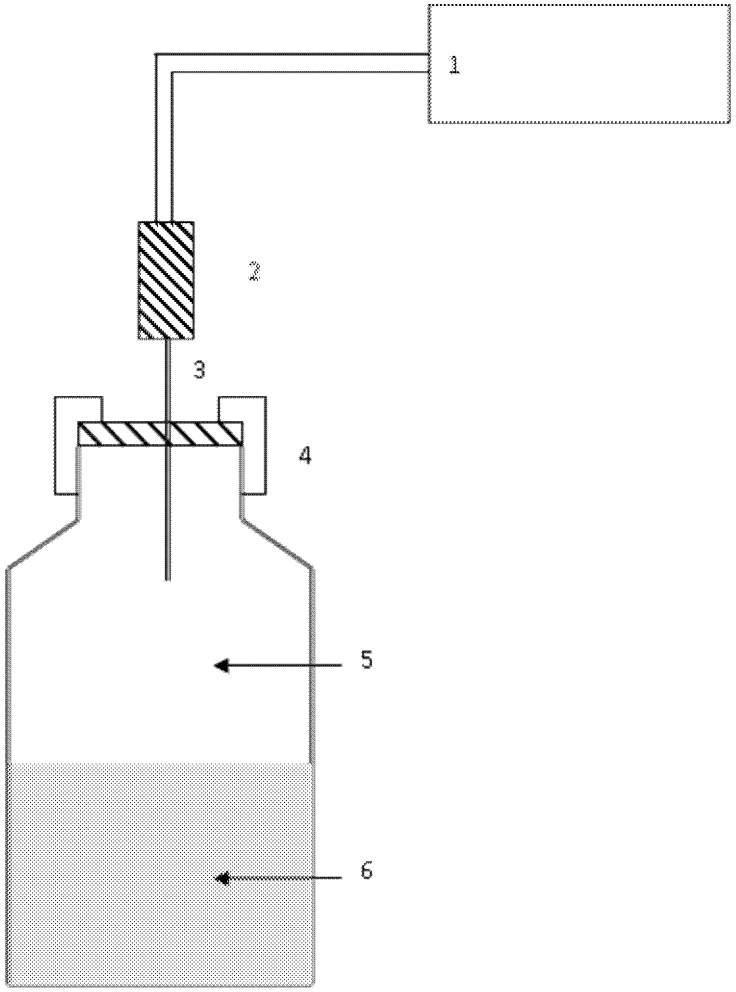
(12) Organisation internationale de normalisation (1995) ISO 10 634 Qualité de l'eau — Lignes directrices pour la préparation et le traitement de composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux.

(13) Organisation internationale de normalisation (1997) ISO 11 923 Qualité de l'eau — Dosage des matières en suspension par filtration sur filtre en fibres de verre.

▼**M6**

Appendice 1

Exemple d'un appareil permettant de mesurer la production de biogaz d'après la pression gazeuse



Légende

1 — Manomètre

2 — Robinet 3 voies étanche aux gaz

3 — Aiguille de seringue

4 — Bouchon étanche aux gaz (septum et capsule sertis)

5 — Espace libre

6 — Inoculum de boue digérée

Récipient d'essai maintenu à 35 °C ± 2 °C

▼**M6**

Appendice 2

Conversion des mesures manométriques

Les pressions relevées au manomètre peuvent être rapportées à des volumes gazeux à l'aide d'une courbe de référence à partir de laquelle le volume de gaz produit par gramme de boue sèche par 48 heures peut être calculé. Cet indice d'activité est l'un des critères d'évaluation de la validité des résultats de l'essai. La courbe de référence est obtenue en injectant des volumes de gaz connus à 35 °C ± 2 °C dans des flacons à sérum contenant un volume d'eau égal à celui du mélange réactionnel, V_R;

— Verser des fractions aliquotes de V_R ml d'eau, maintenues à 35 °C ± 2 °C dans cinq flacons à sérum. Fermer hermétiquement les flacons et les plonger dans un bain d'eau à 35 °C ± 2 °C pendant 1 heure pour les laisser s'équilibrer;

— Enclencher le manomètre, attendre qu'il se stabilise et le régler à zéro;

— Insérer l'aiguille de la seringue à travers le bouchon de l'un des flacons, ouvrir le robinet jusqu'à ce que le manomètre indique zéro et fermer le robinet;

— Répéter ce processus avec les autres flacons;

— Injecter 1 ml d'air à 35 °C ± 2 °C dans chaque flacon. Insérer l'aiguille (montée sur le manomètre) à travers le bouchon de l'un des flacons et attendre que la valeur affichée se stabilise. Noter la pression, ouvrir le robinet jusqu'à ce que la pression retombe à zéro, puis fermer le robinet;

— Répéter ce processus avec les autres flacons;

— Répéter la totalité du processus en appliquant des volumes d'air de 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml et 50 ml;

— Tracer une courbe de conversion de la pression (Pa) en fonction du volume de gaz injecté (ml). La réponse de l'instrument est linéaire sur l'intervalle compris entre 0 Pa et 70 000 Pa, et entre 0 ml et 50 ml de gaz produit.

▼**M6**

Appendice 3

Identification des facteurs à l'origine de résultats erronés

a) *Qualité des bouchons de flacons*

Différents types de septums pour les flacons de sérums sont disponibles dans le commerce; nombre d'entre eux, en particulier le caoutchouc butyle, perdent leur étanchéité après avoir été percés d'une aiguille dans les conditions de cet essai. Il arrive que la pression chute très lentement une fois le septum percé par l'aiguille de seringue. L'utilisation de septums étanches aux gaz est recommandée pour éviter les fuites [paragraphe 12 b)].

b) *Humidité dans l'aiguille de la seringue*

L'humidité s'accumule parfois dans l'aiguille et le tube de la seringue, ce qui est signalé par une valeur de pression faiblement négative. Cet incident est corrigé en retirant l'aiguille et en secouant le tube, en le séchant avec un mouchoir en papier et en montant une aiguille neuve (paragraphes 12 c) et 35).

c) *Contamination par l'oxygène*

Les méthodes anaérobies sont sensibles aux erreurs engendrées par une contamination par l'oxygène qui peut réduire la production de gaz. L'utilisation de techniques strictement anaérobies, en particulier grâce à la boîte à gants, permet de restreindre au minimum ces problèmes.

d) *Substrats bruts dans la boue*

La production anaérobie de gaz et la sensibilité de la boue sont influencées par des substrats transférés avec l'inoculum dans les flacons d'essais. La boue digérée provenant de digesteurs anaérobies domestiques contient encore souvent des matières identifiables comme des poils et des résidus végétaux de cellulose, qui compliquent la tâche de prélèvement d'échantillons représentatifs. Les matières insolubles grossières peuvent être éliminées de la boue par tamisage, pour augmenter la représentativité de l'échantillonnage (paragraphe 16).

e) *Substances chimiques d'essai volatiles*

Les substances chimiques d'essai volatiles se dégagent dans l'espace vide des flacons d'essai. Elles sont donc susceptibles de s'échapper en partie du système pendant la ventilation qui suit les mesures de pression, ce qui se traduira par des valeurs de CE_{50} fictivement élevées. Ce type d'erreurs peut être réduit par le choix approprié d'un rapport volume vide à volume de liquide et par la suppression de la ventilation après les mesures de pression (10).

f) *Non-linéarité de la production de gaz*

Lorsque la courbe de production de gaz cumulée moyenne en fonction de la durée d'incubation ne tend pas vers la linéarité pendant la période de 48 h, la précision de l'essai peut diminuer. Il est conseillé, pour résoudre ce problème, d'utiliser une boue de digestion d'origine différente ou d'ajouter des concentrations plus élevées de substrat d'essai et de bouillon de nutriment, d'extrait de levure et de glucose (paragraphe 29).

▼M6

Appendice 4

Application aux échantillons environnementaux à faible concentration de biomasse — vases anaérobies, sédiments, etc.

INTRODUCTION

A.1 En général, l'activité microbienne spécifique (volume de gaz produit par gramme de solides secs) des vases, des sédiments, et des sols anaérobies naturels est très inférieure à celle d'une boue anaérobie prélevée dans des eaux usées. C'est pourquoi il est nécessaire de modifier certaines conditions expérimentales pour mesurer les effets inhibiteurs de produits chimiques sur ces échantillons moins actifs. Dans ce cas, deux approches sont possibles:

a) Procéder un essai préliminaire modifié (paragraphe 25) avec l'échantillon de vase, de sol, etc non dilué à 35 °C ± 2 °C ou à la température du site de prélèvement de l'échantillon, pour optimiser la simulation (comme c'est le cas dans la partie 1 de la norme ISO 13 641);

b) ou bien mettre en œuvre l'essai avec une boue de digesteur diluée (100 fois) afin de simuler l'activité réduite escomptée de l'échantillon environnemental, tout en maintenant la température à 35 °C ± 2 °C (comme dans la partie 2 de la norme ISO 13 641).

A.2 L'option (a) peut être adoptée conformément à la méthode décrite ici (qui est équivalente à la partie 1 de la norme ISO 13 641), mais il est essentiel de déterminer les conditions optimales par un essai préliminaire (paragraphe 25), à moins qu'elles ne soient déjà connues grâce à des essais antérieurs. L'échantillon de vase ou de sédiment doit être parfaitement mélangé, par exemple dans un mélangeur, et, s'il y a lieu, dilué avec une proportion mineure d'eau de dilution désaérée (paragraphe 14) afin de lui conférer une fluidité suffisante pour son transfert par une pipette à large pointe ou une éprouvette graduée. Dans le cas où l'on estime que la quantité de nutriments pourrait être insuffisante, il est possible de centrifuger l'échantillon de vase (en conditions anaérobies) et de le remettre en suspension dans un milieu minéral contenant de l'extrait de levure (A.11).

A.3 Option (b). Cette approche reproduit convenablement l'activité réduite des échantillons environnementaux, à l'exception de la concentration élevée en matières solides en suspension présente dans ces échantillons. Le rôle qu'elles jouent dans l'inhibition est inconnu, mais une réaction éventuelle entre les substances chimiques d'essai et les constituants de la vase, ou bien l'adsorption des substances chimiques d'essai sur les solides, pourrait réduire la toxicité de la substance chimique d'essai.

A.4 La température est un autre facteur important: une simulation rigoureuse exige de procéder aux essais à la température du site d'échantillon, sachant que des groupes différents de consortium méthanogènes de bactéries sont fonctionnels dans des intervalles de températures différents, à savoir les groupes thermophiles (~ 30-35 °C), mésophiles (20-25 °C) et psychrophiles (< 20 °C), dont les modèles d'inhibition peuvent être différents.

A.5 Durée. Dans l'essai général, Partie 1, sur boue non diluée, la production de gaz en 2-4 jours suffit toujours largement, tandis que dans la partie 2 sur boue diluée 100 fois, la production de gaz, lorsqu'elle existe, s'est révélée insuffisante dans ce délai selon l'essai tournant. Madsen et al (1996), dans leur description de ce second type d'essai, proposent une période de 7 jours.

Essais avec une faible concentration de biomasse (option b)

Les modifications et amendements suivants doivent être apportés, et s'ajoutent à certains des paragraphes ou sous-paragraphes existants du texte principal ou les remplacent.

▼**M6**

A.6 Ajout au paragraphe 6: Principe de l'essai;

«Cette technique peut être utilisée avec une boue anaérobie diluée 100 fois, pour simuler en partie la faible activité des vases et des sédiments. La température d'incubation peut être égale à 35 °C, ou à la température du site de prélèvement de l'échantillon. En raison d'une activité bactérienne très inférieure à celle d'une boue non diluée, la période d'incubation peut être prolongée jusqu'à au moins 7 jours.»

A.7 Ajout au paragraphe 12 (a):

«l'incubateur doit être capable de fonctionner à des températures de l'ordre de 15 °C.»

A.8 Ajout d'un réactif supplémentaire après le paragraphe 13:

«Acide phosphorique (H_3PO_4), 85 % en masse dans l'eau.»

A.9 Ajout à la fin du paragraphe 16:

«Utiliser une concentration finale de 0,20 ± 0,05 g/l de matières solides sèches totales dans l'essai.»

A.10 Paragraphe 17. Substrat d'essai

Ce substrat n'est pas utilisé, mais remplacé par de l'extrait de levure (voir paragraphes 17; A.11, A.12, A.13).

A.11 La boue anaérobie doit être diluée par un milieu minéral, contenant des oligo-éléments, et le substrat organique, l'extrait de levure, est ajouté pour des raisons pratiques à ce milieu.

Ajout après le paragraphe 17:

«(a) Milieu minéral d'essai, contenant de l'extrait de levure.

Ce milieu est préparé à partir d'un milieu d'essai concentré 10 fois [paragraphe 17 (b); A.12] contenant une solution d'oligo-éléments [paragraphe 17 (c); A.13]. Utiliser du sulfure de sodium nonahydraté préparé extemporanément (paragraphe 17 (b); A.12) ou lavé et séché avant utilisation afin de s'assurer qu'il soit suffisamment réducteur. Dans le cas où l'essai est mis en œuvre sans boîte à gants [paragraphe 12 (j)], la concentration finale de sulfure de sodium dans la solution mère peut être portée à 2 g/l [au lieu de 1 g/l]. Le sulfure de sodium peut également être ajouté à partir d'une solution mère appropriée à travers le septum des flacons d'essai fermés, ce mode opératoire diminuant le risque d'oxydation, jusqu'à obtenir une concentration finale de 0,2 g/l. On peut également utiliser du citrate de titane (III) [paragraphe 17 (b)]. Celui-ci est ajouté à travers le septum des flacons d'essai fermés, pour ajuster la concentration entre 0,8 mmol/l et 1,0 mmol/l. Le citrate de titane (III) est un agent réducteur très efficace et peu toxique que l'on peut préparer de la manière suivante: dissoudre 2,94 g de citrate de sodium dihydraté dans 50 ml d'eau de dilution sans oxygène (paragraphe 14) (on obtient alors une solution à 200 mmol/l) et ajouter 5 ml d'une solution de chlorure de titane (II) (15 g/100 ml d'eau de dilution). Neutraliser à pH 7± 0,5 avec du carbonate de sodium et verser dans un flacon à sérum approprié sous un courant d'azote gazeux. La concentration du citrate de titane (III) dans cette solution mère est égale à 164 mmol/l. Utiliser le milieu d'essai immédiatement ou bien le conserver à 4 °C pendant une journée au maximum.

A.12 b) Milieu d'essai concentré 10 fois, préparé à partir des composants suivants:

dihydrogénophosphate de potassium anhydre (KH_2PO_4)	2,7 g
hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4)	4,4 g
(ou 11,2 g de dodécahydrate)	5,3 g
chlorure d'ammonium (NH_4Cl)	

▼**M6**

chlorure de calcium dihydraté ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,75 g
chlorure de magnésium hexahydraté ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
chlorure de fer (II) tétrahydraté ($FeSO_4 \cdot 4H_2O$)	0,2 g
résazurine (indicateur d'oxygène)	0,01 g
sulfure de sodium nonahydraté ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	1,0 g
[ou citrate de titane (III) citrate] concentration finale	0,8 mmol/l à 1,0 mmol/l
solution d'oligo-élément [voir paragraphe 17 (c); A.13]	10,0 ml
extrait de levure	100 g
dissoudre dans de l'eau de dilution (paragraphe 14) et ajuster à:	1 000 ml

A.13 c) Solution d'oligo-éléments, préparée à partir des composants suivants:

chlorure de manganèse (II) tétrahydraté ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,5 g
acide ortho-borique (H_3BO_3)	0,05 g
chlorure de zinc ($ZnCl_2$)	0,05 g
chlorure de cuivre (II) ($CuCl_2$)	0,03 g
molybdate de sodium dihydraté ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,01 g
chlorure de cobalt (II) hexahydraté ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
chlorure de nickel (II) hexahydraté ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,1 g
sélénite de sodium (Na_2SeO_3)	0,05 g
dissoudre dans de l'eau de dilution (paragraphe 14) et ajuster à:	1 000 ml»

A.14 Paragraphe 25: Essai préliminaire

Il est essentiel de procéder à un essai préliminaire comme il est décrit dans le paragraphe 24, mais en employant des concentrations de matières solides de boue égales à un centième de celles indiquées, c'est-à-dire 0,1 g/l, 0,2 g/l et 0,4 g/l. La durée d'incubation doit être d'au moins 7 jours.

Note: Dans l'essai tournant (5), le volume vide, qui représentait 75 % du volume total, était beaucoup trop élevé. Il devrait se situer dans l'intervalle recommandé de 10 %-40 %. Le critère décisif à satisfaire est l'obtention d'un volume de gaz produit mesurable avec une précision acceptable (par exemple ± 5 % à ± 10 %) pour une inhibition d'environ 80 %.

A.15 Paragraphes 26 à 30: Addition de substance chimique d'essai, d'inoculum et de substrat.

L'introduction de ces composants est identique à celle qui est décrite dans ces paragraphes, en remplaçant la solution de substrats (paragraphe 17) par le milieu d'essai additionné de substrat d'extrait de levure (A.11).

En outre, la concentration finale de matières solides de boue sèche est réduite de 2 g/l – 4 g/l à 0,2 ± 0,05 g/l (A.9). Le tableau A.1, qui remplace le tableau du paragraphe 29, présente deux exemples d'addition des composants au mélange d'essai.

A.16 Paragraphe 33: Incubation des flacons

La vitesse de production de gaz attendue étant plus faible, l'incubation dure au moins 7 jours.

▼**M6**

A.17 Paragraphe 34: Mesures de pression

Le mode opératoire de mesure de la pression dans l'espace vide des flacons est identique à celui décrit au paragraphe 34 lorsqu'il est aussi nécessaire d'analyser les quantités dans la phase gazeuse. Lorsque l'on mesure les quantités totales de CO_2 et de CH_4, le pH de la phase liquide est abaissé à environ pH 2 par l'injection de H_3PO_4 dans chaque flacon concerné et la pression est mesurée au bout de 30 minutes d'agitation à la température de l'essai. Toutefois, la mesure de la pression dans chaque flacon avant et après acidification fournira davantage d'informations sur la qualité de l'inoculum. Par exemple, si le CO_2 est produit beaucoup plus rapidement que le méthane, la sensibilité des bactéries fermentaires est peut-être modifiée, ou bien les bactéries méthanogènes sont préférentiellement affectées par la substance chimique d'essai.

A.18 Paragraphe 36: mesure du pH

S'il est nécessaire d'utiliser du H_3PO_4, il convient de préparer quelques flacons supplémentaires sans addition de H_3PO_4, en particulier pour la mesure du pH.

RÉFÉRENCE:

Madsen, T, Rasmussen, HB; and Nilsson, L (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No.336, Water Quality Institute, Danish Environment Protection Agency, Copenhagen.

Tableau A.1

Exemples d'organisation de l'essai pour des lots d'essai

Mélange réactionnel composants	Exemple 1	Exemple 2	Ordre normal d'addition
Concentration de l'inoculum préparé (g/l)	0,42	2,1	—
Volume d'inoculum ajouté (ml)	45	9	4
Concentration d'inoculum dans les flacons d'essai (g/l)	0,20	0,20	—
Volume de milieu d'essai ajouté (ml)	9	9	2
Volume d'eau de dilution ajouté (ml)	36	72	3
Concentration d'extrait de levure dans les flacons d'essai (g/l)	9,7	9,7	—
Volume de solution mère de substance chimique d'essai (ml)	3	3	1
Volume total de liquide (ml) i	93	93	—

▼**M6**

Appendice 5

Définitions

Aux fins de la présente méthode d'essai, les définitions suivantes s'appliquent:

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼M6

C.35. ESSAI DE TOXICITÉ SUR *LUMBRICULUS* DANS UN SYSTÈME EAU-SÉDIMENT CHARGÉ

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 225 (2007) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les animaux endobenthiques qui ingèrent des sédiments sont soumis à un risque d'exposition substantielle aux substances liées aux sédiments, et soulèvent par conséquent un grand intérêt, par exemple (1), (2), (3). Parmi les organismes de ce type, les oligochetes aquatiques jouent un rôle important dans les sédiments des systèmes aquatiques. Leur implication dans la bioturbation du sédiment et leur fonction de proie pourraient leur conférer une influence considérable sur la biodisponibilité de ces substances pour d'autres organismes, par exemple les poissons benthivores. Au contraire des organismes épibenthiques, les oligochetes aquatiques endobenthiques, (par exemple, *Lumbriculus variegatus*) s'enfouissent dans le sédiment et ingèrent des particules en dessous de la surface sédimentaire. L'exposition des organismes expérimentaux aux substances chimiques d'essai par toutes les voies d'absorption possibles (par exemple contact, ingestion de particules de sédiment contaminé, mais également par l'intermédiaire de l'eau interstitielle, et de l'eau sus-jacente) est ainsi assurée.

2. La présente méthode d'essai a pour objectif d'évaluer les effets d'une exposition prolongée de l'oligochete endobenthique *Lumbriculus variegatus* (Müller) aux substances chimiques associées au sédiment. Elle est fondée sur des protocoles existants d'essais de toxicité et de bioaccumulation dans les sédiments, par exemple (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). La méthode est décrite dans des conditions d'essai statiques. Le mode d'exposition utilisé dans cette méthode d'essai consiste à charger le sédiment de la substance chimique d'essai, dans l'intention de l'utiliser pour simuler un sédiment contaminé par la substance chimique d'essai.

3. Les substances qu'il faut tester sur des organismes vivant dans le sédiment présentent généralement une persistance de longue durée dans ce compartiment. Plusieurs voies d'exposition sont valides pour les organismes résidant dans ce milieu. L'importance relative de chaque voie et le délai nécessaire à leur contribution aux effets toxiques globaux dépendent des propriétés physico-chimiques du produit concerné et de sa destination finale dans l'animal. Dans le cas des substances dont l'absorption est très élevée (par exemple, avec log K_{oe} > 5) ou de substances liées par covalence aux sédiments, l'ingestion d'aliments contaminés peut se révéler une voie d'exposition significative. Pour éviter toute sous-estimation de la toxicité de ces substances, les aliments nécessaires à la reproduction et à la croissance des organismes d'essai sont ajoutés au sédiment avant application de la substance chimique d'essai (11). La méthode décrite ici est suffisamment détaillée pour permettre la conduite de l'essai tout en admettant des adaptations du modèle expérimental aux conditions des laboratoires concernés et aux diverses caractéristiques des substances chimiques d'essais.

4. La méthode expérimentale a pour objectif de déterminer les effets d'une substance chimique d'essai sur la reproduction et la biomasse des organismes d'essai. Les paramètres biologiques mesurés sont les suivants: nombre total de vers survivants et biomasse (poids sec) en fin d'exposition. Ces données sont analysées à l'aide d'un modèle de régression afin d'estimer la concentration responsable d'un effet de x % (par exemple CE_{50}, CE_{25}, et CE_{10}), ou par vérification d'une hypothèse statistique visant à déterminer la concentration sans effet observé (CSEO) et la concentration minimale avec effet observé (CMEO).

5. Le chapitre C.27 de la présente annexe «Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau-sédiment dopé» (6) fournit de nombreux détails essentiels et utiles à la mise en œuvre de la présente méthode d'essai de toxicité sur sédiment. Par conséquent, ce document a servi de base à laquelle ont été apportées les modifications nécessaires à la réalisation d'essais de toxicité sur sédiment avec *Lumbriculus variegatus*. On se référera également, par exemple, aux documents suivants: ASTM Standard Guide for Determination of the Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants by Benthic

▼M6

Invertebrates (3), the U.S. EPA Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates (7), et ASTM Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates (12). De surcroît, l'expérience pratique acquise pendant l'essai circulaire de la méthode [(13), rapport d'essai circulaire], et les précisions recueillies dans la littérature constituent des sources d'informations importantes pour la rédaction de ce document.

PRÉREQUIS ET RECOMMANDATIONS

6. Il conviendra d'obtenir avant le début de l'étude des informations concernant la substance chimique d'essai, par exemple, en termes précautions à prendre pour assurer la sécurité, de conditions de stockage appropriées et de méthodes analytiques. Des conseils à propos des substances d'essai dont les propriétés physicochimiques compliquent la mise en œuvre de l'essai sont proposés dans (14).

7. Avant la réalisation d'un essai, les informations suivantes sur la substance chimique d'essai doivent être disponibles:

   — nom courant, nom chimique (de préférence nom IUPAC), formule structurale, numéro d'enregistrement CAS, pureté;

   — pression de vapeur;

   — solubilité dans l'eau.

8. Les informations complémentaires suivantes sont estimées utiles avant le début de l'essai:

   — coefficient de partage octanol-eau, K_{oe};

   — coefficient de partage carbone organique-eau, exprimé par K_{co};

   — hydrolyse;

   — phototransformation dans l'eau;

   — biodégradabilité;

   — tension superficielle.

9. Des informations sur certaines caractéristiques du sédiment utilisé doivent être connues avant de commencer l'essai (7). On se référera aux paragraphes 22 à 25 pour plus de détails à ce sujet.

PRINCIPE DE L'ESSAI

10. Des vers dans un état physiologique similaire (synchronisés comme il est décrit dans l'Appendice 5) sont exposés à une substance toxique à une série de concentrations appliquées à la phase sédiment d'un système sédiment-eau. Il convient d'utiliser comme milieu un sédiment artificiel et de l'eau reconstituée. Des récipients expérimentaux sans adjonction de substance chimique d'essai servent de témoins. La substance chimique d'essai est introduite dans le sédiment dans un grand volume à chaque concentration afin de réduire au minimum la variabilité entre les expériences identiques et les organismes d'essai sont inoculés ensuite dans les récipients dans lesquels ont été équilibrées les concentrations de sédiments et d'eau (voir paragraphe 29). Les animaux d'essai sont exposés au système sédiment-eau pendant une durée de 28 jours. Le sédiment artificiel ne contenant que de petites quantités de nutriments, il faut l'enrichir par l'apport d'une source d'aliments (voir paragraphes 22 à 23, et Appendice 4) afin de garantir la croissance et la reproduction des vers dans des conditions contrôlées. On s'assure ainsi que l'exposition des animaux expérimentaux s'opère par l'intermédiaire de l'eau et du sédiment ainsi que par leur alimentation.

11. L'effet préférentiellement analysé dans ce type d'étude est la CE_x (par exemple CE_{50}, CE_{25}, et CE_{10}; concentration avec un effet qui affecte x % des organismes expérimentaux) pour la reproduction et la biomasse, respectivement, relativement au témoin. Toutefois, il convient de noter qu'en

▼M6

raison de l'incertitude élevée qui marque les CE_x aux basses valeurs (e.g. CE_{10}, CE_{25}), qui sont associées à des limites de confiance de 95 % extrêmement élevées (par exemple (15)) et de la puissance statistique calculée au cours de la vérification de l'hypothèse, la CE_{50} est considérée comme le résultat le plus fiable. En outre, on peut calculer la concentration sans effet observé (CSEO) et la concentration minimale avec effet observé (CMEO) pour la biomasse et la reproduction, sous réserve que le modèle d'essai et les résultats permettent ces calculs (voir paragraphes 34 à 38). L'objectif de l'étude, CE_x ou calcul de la CSEO, déterminera le modèle de l'essai.

ESSAI DE RÉFÉRENCE

12. La capacité d'un laboratoire à mener l'essai est d'ordinaire amplement démontré par les performances des organismes témoins, et, lorsque des données historiques sont disponibles, par la répétabilité de l'essai. Il est également possible de mener des essais de toxicité de référence à intervalles réguliers en employant un produit toxique de référence permettant d'évaluer la sensibilité des organismes d'essai. Des tests de toxicité de référence de 96 h dans l'eau devraient suffire à démontrer la sensibilité et la condition des animaux expérimentaux (4)(7). L'Appendice 6 présente des informations sur la toxicité du pentachlorophénol (PCP) dans des essais réalisés (exposition de 28 jours à du sédiment chargé), ainsi que le rapport sur l'essai circulaire de la méthode d'essai (13). La toxicité aiguë du PCP en présence d'eau seule est décrite dans, par exemple, (16). Ces informations peuvent permettre la comparaison de la sensibilité de l'organisme expérimental dans des essais de référence, le PCP faisant fonction de produit toxique de référence. Les produits toxiques de référence recommandés pour *L. variegatus* sont le chlorure de potassium (KCl) ou le sulfate de cuivre ($CuSO_4$) (4)(7). Il est difficile à ce jour d'établir des critères de qualité fondés sur des données de toxicité du KCl, car les résultats de la littérature sur *L. variegatus* font défaut. Des informations sur la toxicité du cuivre sur *L. variegatus* sont fournies dans (17) à (21).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

13. Un essai est validé aux conditions suivantes:

— Un essai circulaire (13) a montré que dans le cas de Lumbriculus variegatus, une augmentation d'un facteur d'au moins 1,8 du nombre moyen des vers vivants par expérience dans les témoins entre le début et la fin de l'exposition doit être atteinte.

— Le pH de l'eau sus-jacente doit être compris entre 6 et 9 pendant toute la durée de l'essai.

— La concentration d'oxygène dans l'eau sus-jacente ne doit pas descendre en dessous de 30 % de sa valeur dans l'air saturé (VAS) à la température appliquée pendant l'essai.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Système expérimental

14. Il est recommandé d'utiliser des systèmes statiques sans renouvellement de l'eau sus-jacente. Lorsque le rapport sédiment à eau (voir paragraphe 15) est adéquat, une légère aération suffira habituellement au maintien de la qualité de l'eau à des niveaux acceptables pour les organismes de l'essai (par exemple, avec obtention de niveaux maximaux d'oxygène dissous et accumulation minimale de produits d'excrétion). Il conviendra de réserver l'utilisation de systèmes semi-statiques ou à écoulement continu avec renouvellement intermittent ou continu de l'eau sus-jacente à des cas exceptionnels, car le renouvellement régulier de l'eau sus-jacente est susceptible d'affecter l'équilibre chimique (par exemple, déperditions de substance chimique d'essai par le système expérimental).

Récipients et appareils expérimentaux

15. L'exposition doit être mise en œuvre dans des béchers en verre, par exemple, de 250 ml, et de 6 cm de diamètre. Il est possible d'utiliser d'autres récipients en verre appropriés, sous réserve qu'ils garantissent une profondeur convenable d'eau sus-jacente et de sédiment. Une couche d'environ 1,5-3 cm de sédiment formulé sera introduite dans chaque récipient. Le rapport

▼M6

de la profondeur de la couche de sédiment à la profondeur de la couche d'eau sus-jacente doit être égal à 1:4. Le volume des récipients doit être adapté au taux de charge, c'est-à-dire au nombre de vers de l'essai ajoutés par unité pondérale de sédiment (voir également paragraphe 39).

16. Les récipients expérimentaux et les autres appareils susceptibles d'entrer en contact avec la substance chimique d'essai doivent être entièrement constitués de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte. Il conviendra d'éviter avec soin l'utilisation dans toutes les parties de l'équipement de matériaux capables de dissoudre ou d'absorber les substances chimiques d'essai ou de laisser s'échapper d'autres substances exerçant un effet indésirable sur les animaux de l'essai. Il faut utiliser du polytétrafluoréthylène (PTFE), de l'acier inoxydable et/ou du verre dans tous les équipements entrant en contact avec le milieu d'essai. En présence de substances organiques qui s'adsorbent sur le verre, il faudra éventuellement employer un verre silanisé. Dans ce cas, l'équipement sera jeté après utilisation.

Espèce expérimentale

17. L'espèce expérimentale utilisée dans ce type d'études est l'oligochete d'eau douce *Lumbriculus variegatus* (Müller). Cette espèce tolère une large gamme de sédiments et est largement utilisée dans les essais de toxicité et de bioaccumulation dans les sédiments (par exemple, (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)). Il conviendra de définir l'origine des animaux de l'essai, de confirmer l'identité de l'espèce (par exemple (36)) et d'expliciter les conditions de culture. Il n'est pas nécessaire d'identifier l'espèce avant chaque essai lorsque les organismes proviennent d'une culture sur site.

Culture des organismes expérimentaux

18. Afin de disposer d'un nombre suffisant de vers pour mener des essais de toxicité sur sédiment, il est utile de maintenir en permanence une culture de vers au laboratoire. Des directives pour les méthodes de culture en laboratoire de Lumbriculus variegatus, et des sources de culture de départ sont indiquées dans l'Annexe 5. Des détails sur la culture de cette espèce sont fournis dans les références (3), (7), (27).

19. Il est fermement recommandé d'établir des cultures d'espèces individuelles pour garantir la mise en œuvre des essais sur des animaux de la même espèce. On s'assurera que les cultures, et en particulier les vers utilisés dans les essais, sont exemptes de maladies et d'anomalies visibles.

Eau

20. L'utilisation dans les essais d'eau reconstituée conformément au chapitre C.1 de la présente annexe (37) comme eau sus-jacente est recommandée; on peut également l'utiliser pour les cultures des vers en laboratoire (voir Appendice 2 pour la préparation). Si nécessaire, de l'eau naturelle peut être utilisée. La qualité de l'eau choisie doit permettre la croissance et la reproduction de l'espèce expérimentale au cours des périodes d'acclimatation et d'essai, sans manifestation d'une apparence ou d'un comportement anormal quelconque. On a démontré que *Lumbriculus variegatus* survivait, se développait et se reproduisait dans ce type d'eau (30) et elle permet une standardisation maximale des conditions d'essai et de culture. Dans le cas de l'utilisation d'une eau reconstituée, il conviendra d'en indiquer la composition et de la caractériser avant son utilisation, au moins en termes de pH, de teneur en oxygène et de dureté (exprimée en mg de $CaCO_3$/l). La détection d'éventuels micropolluants dans l'eau avant son utilisation devrait fournir des informations utiles (voir, par exemple, Appendice 3).

21. Le pH de l'eau sus-jacente doit être compris dans l'intervalle de 6,0 à 9,0 (voir paragraphe 13). Si un dégagement d'ammoniac important est à prévoir, on considère qu'il est utile de maintenir le pH entre 6,0 et 8,0. Lors de l'analyse d'acides organiques faibles, par exemple, il est conseillé d'ajuster le pH en tamponnant l'eau utilisée dans l'essai, comme il est décrit, par exemple, dans (16). La dureté totale de l'eau utilisée dans l'essai doit être comprise entre 90 et 300 mg de $CaCO_3$ par litre pour l'eau naturelle. L'Appendice 3 résume d'autres critères caractérisant une eau de dilution acceptable conformément à la Ligne directrice N° 210 de l'OCDE (38).

▼M6

Sédiment

22. Les sédiments naturels non contaminés provenant d'une source particulière ne sont pas toujours disponibles tout au long de l'année, et des organismes indigènes ainsi que la présence de micropolluants peuvent influer sur l'essai, et par conséquent, il est préférable d'utiliser un sédiment formulé (également dénommé sédiment reconstitué, artificiel ou synthétique). L'utilisation d'un sédiment formulé limite la variabilité des conditions d'essais, ainsi que l'introduction d'une faune indigène. Le sédiment suivant a été formulé à partir du sédiment artificiel décrit dans (6), (39), et (40). Son utilisation est recommandée dans ce type d'essai [(6), (10), (30), (41), (42), (43)]:

a) 4-5 % (poids sec) de tourbe à sphaignes; il est important d'utiliser la tourbe sous forme pulvérisée avec un degré de décomposition «moyen», finement broyée (dimension des particules ≤ 0,5 mm), et séchée uniquement à l'air.

b) 20 ± 1 % (poids sec) d'argile kaolinique (teneur en kaolinite de préférence supérieure à 30 %).

c) 75-76 % (poids sec) de sable quartzique (sable fin, dimension des grains: ≤ 2 mm, mais plus de 50 % des particules doivent mesurer de 50 à 200 μm).

d) Eau désionisée, 30–50 % de poids sec du sédiment, en plus des composants du sédiment sec.

e) Carbonate de calcium de qualité chimiquement pure ($CaCO_3$), ajouté pour ajuster le pH du mélange final du sédiment.

f) La teneur en carbone organique total (TCO) du mélange final doit être égale à 2 % (± 0,5 %) du poids sec de sédiment, ajustée à l'aide de quantité appropriée de tourbe et de sable, comme indiqué en (a) et (c).

g) Des aliments, par exemple, feuilles pulvérisées d'ortie (Urtica sp., conformément aux normes pharmaceutiques, pour consommation humaine), ou un mélange de feuilles pulvérisées d'Urtica sp. avec de l'alpha-cellulose (1: 1), à 0,4 - 0,5 % de poids sec de sédiment, en plus des composants secs du sédiment; pour d'autres détails, on se référera à l'Appendice 4.

23. Les sources de tourbe, d'argile kaolinique, d'aliments et de sable doivent être connues. Outre ceux du (g) ci-dessus, le chapitre C.27 de la présente annexe (6) énumère d'autres substances végétales susceptibles d'être utilisées comme sources d'aliments: feuilles déshydratées de mûrier (*Morus alba*), de trèfle blanc (*Trifolium repens*), d'épinard (*Spinacia oleracea*), ou céréales.

24. La source d'aliments choisie doit être ajoutée avant ou pendant l'introduction de la substance chimique d'essai dans le sédiment. Elle doit permettre au moins une reproduction acceptable dans les échantillons témoins. L'analyse des micropolluants dans le sédiment artificiel ou ses constituants avant utilisation devrait fournir des informations utiles. Un exemple de préparation du sédiment formulé est décrit dans l'Appendice 4. Il est également possible de mélanger des constituants secs, sous réserve de démontrer qu'après l'addition de l'eau sus-jacente, il n'y a pas séparation des constituants du sédiment (par exemple particules de tourbe flottante) et que la tourbe ou le sédiment est suffisamment conditionné (voir également paragraphe 25 et Appendice 4). Il faut au moins caractériser le sédiment artificiel par l'origine de ses constituants, la distribution des tailles de grains (pourcentage de sable, limon et d'argile), sa teneur en carbone organique total (TCO), sa teneur en eau, et son pH. La mesure du potentiel redox est optionnelle.

25. Le cas échéant, par exemple dans des objectifs d'analyse spécifique, il est possible d'utiliser des sédiments naturels provenant de sites non pollués comme sédiments d'essai et/ou de culture (3). Toutefois, dans ce cas, il conviendra de les caractériser au moins par leur origine (site de collecte), leur pH et la teneur en ammoniac de l'eau interstitielle, la teneur en carbone

▼M6

organique total (TCO) et la teneur en azote, la distribution de tailles de particules (pourcentage de sable, de limon et d'argile) et la proportion d'eau (7)), et ils devront être exempts de toute contamination et d'autres organismes susceptibles d'entrer en compétition avec les organismes de l'essai ou d'en faire des proies. La mesure du potentiel redox et de la capacité d'échange de cations est optionnelle. Il est également recommandé d'adapter le sédiment naturel pendant 7 jours aux paramètres appliqués dans l'essai consécutif avant d'introduire la substance chimique d'essai. A la fin de cette période de conditionnement, il faut retirer et jeter l'eau sus-jacente.

26. La qualité du sédiment utilisé doit permettre la survie et la reproduction des organismes témoins tout au long de la période d'exposition, sans manifestation d'apparence ou de comportement anormal quelconque. Les vers témoins doivent s'enfouir dans le sédiment et l'ingérer. La reproduction dans les témoins doit au moins se conformer aux critères de validité présentés dans le paragraphe 13. La présence ou l'absence de granules fécaux sur la surface du sédiment, preuves de l'ingestion de sédiment par les vers, doit être notée et peut faciliter l'interprétation des résultats de l'essai relativement aux voies d'exposition. D'autres informations sur l'ingestion du sédiment peuvent être collectées par les méthodes décrites dans (24), (25), (44), et (45), qui caractérisent l'ingestion de sédiments ou la sélection de particules dans les organismes.

27. Les protocoles de manipulation des sédiments naturels avant leur utilisation au laboratoire sont décrits dans (3), (7) et (12). La préparation et le stockage du sédiment artificiel dont l'utilisation est recommandée dans l'essai sur *Lumbriculus* sont décrits dans l'Appendice 4.

Application de la substance chimique d'essai

28. La substance chimique d'essai doit être introduite dans le sédiment. La faible solubilité dans l'eau de la plupart des substances chimiques d'essai impose leur dissolution dans un solvant organique approprié (par exemple acétone, n-hexane, cyclohexane) dans un volume aussi faible que possible, lors de la préparation de la solution stock. La solution stock doit être diluée avec le même solvant pour préparer les solutions d'essai. Le choix d'un agent solubilisant approprié s'appuiera sur quelques critères majeurs, tels que la toxicité et la volatilité du solvant et la solubilité de la substance chimique d'essai dans le solvant choisi. Il convient d'employer à chaque concentration le même volume de solution correspondante. Le sédiment doit être chargé avec un grand volume à chaque concentration afin de modérer autant que possible la variabilité entre les expériences à concentrations identiques de substance chimique d'essai. Les solutions d'essai sont ensuite mélangées avec du sable quartzique comme il est décrit au paragraphe 22 (par exemple 10 g de sable quartzique par récipient expérimental). Un volume de 0,20 - 0,25 ml par g de sable s'est révélé suffisant pour immerger complètement le sable quartzique. Ensuite, le solvant doit être évaporé à sec. Pour limiter les déperditions de substance d'essai par co-évaporation (par exemple, liée à la pression de vapeur de la substance), le sable enrobé doit être utilisé immédiatement après séchage. Le sable sec est mélangé avec la quantité adéquate de sédiment formulé à la concentration correspondante. Lors de la préparation du sédiment, la quantité de sable introduite par le mélange de substance chimique d'essai et de sable doit être prise en compte (le sédiment doit donc être préparé avec la plus petite quantité de sable possible). Ce protocole a pour principal avantage de n'introduire que très peu de solvant dans le sédiment (7). Il est également possible, par exemple dans le cas d'un sédiment naturel, d'ajouter la substance chimique d'essai en incorporant une portion séchée et finement broyée du sédiment par le procédé décrit ci-dessus pour le sable quartzique ou en agitant la substance d'essai dans le sédiment humide, puis en évaporant la totalité de l'agent solubilisant utilisé. Il conviendra de s'assurer que la substance chimique d'essai ajoutée au sédiment est totalement et uniformément distribuée dans tout le sédiment. Le cas échéant, l'analyse de fractions d'échantillons permettra de confirmer les concentrations cibles dans le sédiment et de déterminer le degré d'homogénéité. L'analyse de fractions des solutions

▼M6

expérimentales peut également être utile pour confirmer les concentrations cibles dans le sédiment. Comme un solvant est utilisé pour déposer la substance chimique d'essai sur le sable quartzique, il faut employer un témoin de solvant préparé avec la quantité de solvant utilisée dans les sédiments de l'essai. La méthode adoptée pour la charge, et les raisons expliquant le choix d'un protocole de charge spécifique différent de celui décrit ci-dessus devront être indiquées. La méthode de charge doit être adaptée aux propriétés physico-chimiques de la substance d'essai, afin d'éviter, par exemple, les pertes dues à la volatilisation pendant la charge ou l'équilibrage. D'autres recommandations sur les protocoles de charge sont présentées dans Environnement Canada (1995) (46).

29. Après la préparation du sédiment chargé, sa distribution dans des récipients d'essai en plusieurs exemplaires, et l'addition de l'eau d'essai, il est souhaitable de laisser la substance chimique d'essai se partager entre le sédiment et la phase aqueuse (par exemple (3)(7)(9)), de préférence, dans les conditions de températures et d'aération utilisées dans l'essai. La durée nécessaire pour atteindre l'équilibre dépend du sédiment et des produits chimiques et se situe entre quelques heures et quelques jours, dans de rares cas, atteint plusieurs semaines (4-5 semaines) (par exemple, (27)(47)). Dans cet essai, l'équilibre complet n'est pas requis, mais une période d'équilibrage de 48 heures à 7 jours est recommandée. La dégradation de la substance chimique d''essai est ainsi limitée dans le temps. Selon l'objectif de l'étude, par exemple, s'il faut reproduire les conditions environnementales, le sédiment chargé peut être équilibré ou vieilli pendant une durée plus longue.

30. Au terme de cette période d'équilibrage, des échantillons sont prélevés au moins dans la couche d'eau sus-jacente et dans la masse du sédiment, au moins à la concentration la plus élevée et à une concentration plus basse, afin d'analyser la concentration de la substance chimique d'essai. Ces mesures analytiques de la substance chimique d'essai doivent permettre le calcul du bilan massique et une expression des résultats fondée sur les concentrations initiales déterminées. Généralement, le prélèvement d'échantillon perturbe ou détruit le système sédiment-eau, c'est pourquoi, il n'est guère possible d'utiliser les mêmes expériences pour le prélèvement de sédiment et de vers. Il faudra préparer d'autres récipients «analytiques» de dimensions appropriées, que l'on traitera de manière identique (y compris par la présence des organismes d'essai), mais qui ne seront pas utilisés pour les observations biologiques. Les dimensions des récipients choisis devront permettre de prélever des quantités d'échantillons exigées par la méthode analytique. La technique de prélèvement est détaillée dans le paragraphe 53.

CONDUITE DE L'ESSAI

Essai préliminaire

31. Faute d'informations disponibles sur la toxicité de la substance chimique d'essai pour *Lumbriculus variegatus*, il est parfois utile de mener une expérience préliminaire afin de déterminer l'intervalle de concentrations qu'il convient de tester dans l'essai proprement dit, et d'optimiser les conditions de cet essai final. A cet effet, on utilise une série de concentrations largement espacées de la substance chimique d'essai. Les vers sont exposés à chaque concentration de la substance chimique d'essai pendant une durée (par exemple, 28 jours comme dans le test final) permettant d'estimer les concentrations expérimentales appropriées; on ne répète pas les expériences. On s'efforcera d'observer et d'enregistrer pendant le test préliminaire le comportement des vers, par exemple, leur tendance à éviter le sédiment, susceptible d'être induit par la substance chimique d'essai et/ou le sédiment. Les concentrations testées dans l'essai préliminaire ne dépasseront pas 1 000 mg/kg de poids sec de sédiment.

Essai final

32. Au moins cinq concentrations doivent être utilisées et sélectionnées pour l'essai proprement dit, en se fondant, par exemple, sur l'essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur (paragraphe 31), comme il est décrit dans les paragraphes 35, 36, 37 et 38.

▼M6

33. Un témoin (pour le nombre d'expériences identiques, voir les paragraphes 36, 37 et 38) contenant tous les constituants à l'exception de la substance chimique d'essai est traité parallèlement à la série de l'essai. Il conviendra de démontrer, à l'aide d'un témoin ne contenant que du solvant, que l'agent solubilisant, quel qu'il soit, utilisé pour l'application de la substance chimique d'essai, ne présente aucun effet significatif sur les organismes expérimentaux.

Modèle de l'essai

34. Le modèle de l'essai définit le nombre des concentrations expérimentales et les intervalles qui les séparent, le nombre de récipients à chaque concentration et le nombre de vers ajoutés par récipient. La marche à suivre pour estimer une CE_x, la CESO et procéder à un essai limite est décrite dans les paragraphes 35, 36, 37 et 38.

35. La concentration avec effet (par exemple, CE_{50} CE_{25}, CE_{10}), et l'intervalle de concentrations dans lequel l'effet de la substance chimique d'essai a un impact, doivent être encadrés par les concentrations incluses dans l'essai. Il faut éviter les extrapolations à des valeurs très inférieures à la concentration la plus faible qui affecte les organismes de l'essai, ou à des valeurs supérieures à la concentration la plus élevée de l'analyse. Si néanmoins, à titre exceptionnel, ce type d'extrapolation est calculé, la raison devra en être détaillée dans le rapport.

36. Pour estimer une CE_x, au moins cinq concentrations et trois expériences identiques par concentration au minimum devront être analysées; on recommande six répétitions pour le témoin ou, le cas échéant, pour le témoin de solvant, afin d'affiner l'estimation de la variabilité entre témoins. En tout état de cause, il est judicieux de tester suffisamment de concentrations pour obtenir une bonne estimation du modèle. Le facteur séparant les concentrations ne doit pas excéder deux (sauf dans les cas où la pente de la courbe de réponse en fonction de la concentration est faible). Le nombre d'expériences identiques par traitement peut être réduit si le nombre de concentrations expérimentales dont les réponses sont comprises dans l'intervalle de 5– 95 % est élevé. L'augmentation du nombre d'expérience identiques ou la réduction de l'intervalle des concentrations expérimentales restreint généralement les intervalles de confiance de l'essai.

37. Si l'estimation des valeurs de CMEO ou de CSEO est recherchée, au moins cinq concentrations expérimentales, chacune testée par au moins quatre expériences identiques (six sont recommandées pour le témoin, ou, le cas échéant, le témoin de solvant afin d'affiner l'estimation de la variabilité des témoins) doivent être analysées, et le facteur séparant les concentrations n'excédera pas deux. L'Appendice 6 fournit des informations sur la puissance statistique déterminée au cours de la vérification de l'hypothèse dans l'essai circulaire de la méthode.

38. La conduite d'un essai limite peut être envisagée (sur une seule concentration et des témoins) dans le cas où aucun effet n'est à prévoir jusqu'à 1 000 mg/kg de poids sec de sédiment (par exemple, d'après un essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur), ou dans le cas où l'analyse d'une concentration unique permet de confirmer une valeur de CSEO d'intérêt. Dans ce dernier cas, une justification détaillée du choix de la concentration seuil doit être intégrée au rapport d'essai. L'intérêt de l'essai limite est d'analyser une concentration suffisamment élevée pour légitimer la décision d'exclure tout éventuel effet toxique de la substance, et la limite est fixée à une concentration impossible à atteindre quelle que soit la situation. La limite recommandée est de 1 000 mg/kg (poids sec). Habituellement, il est nécessaire de répéter l'expérience six fois tant pour les échantillons traités que pour les témoins. L'Appendice 6 fournit des informations sur la puissance statistique déterminée au cours de la vérification de l'hypothèse dans l'essai circulaire de la méthode.

Conditions d'exposition

Organismes de l'essai

39. L'essai est réalisé sur au moins 10 vers pour chaque expérience incluse dans la détermination des paramètres biologiques. Ce nombre correspond à environ 50-100 mg de biomasse fraîche. Avec une teneur en matières sèches estimée de 17,1 % (48) chaque récipient contiendra environ 9 à 17 mg de biomasse sèche. U.S. EPA (2000 (7)) recommande l'utilisation d'un

▼M6

taux de charge n'excédant pas 1: 50 (biomasse sèche: TCO). Dans le cas du sédiment formulé décrit au paragraphe 22, ce taux de charge correspond à environ 43 g de sédiment (poids sec) pour dix vers à une teneur en TCO de 2,0 % de sédiment sec. A plus de 10 vers par récipient, il convient d'ajuster la quantité de sédiment et d'eau sus-jacente en conséquence.

40. Tous les vers utilisés dans un essai doivent provenir de la même source, et présenter un état physiologique similaire (voir Appendice 5). On choisira des vers de taille similaire (voir paragraphe 39). Il est préférable de peser une fraction du lot ou du stock de vers avant l'essai afin d'en estimer le poids moyen.

41. Les vers utilisés dans un essai sont prélevés dans la culture (pour plus de précisions, se reporter à l'Appendice 5). De gros animaux (adultes), ne présentant aucun signe de fragmentation récente, sont transférés dans des boîtes en verre (par exemple, boîtes de Petri) contenant de l'eau pure. Ils sont ensuite synchronisés par le procédé décrit dans l'Appendice 5. Après régénération pendant une période allant de 10 à 14 jours, des vers intacts et complets de taille similaire, nageant ou rampant activement après un léger stimulus mécanique, sont choisis pour l'essai. Lorsque les conditions de l'essai diffèrent des conditions de culture (par exemple, en termes de température, d'éclairement et d'eau sus-jacente), une phase d'acclimatation, par exemple, de 24 h avec des paramètres de température, d'éclairement et d'eau sus-jacente identiques à ceux de l'essai devrait suffire à l'adaptation des vers aux conditions de l'essai. Les oligochetes adaptés sont ensuite répartis au hasard dans les récipients de l'essai.

Alimentation

42. Les aliments sont ajoutés au sédiment avant (ou pendant) l'application de la substance chimique d'essai, et les vers ne sont donc plus nourris pendant l'essai.

Lumière et température

43. La photopériode appliquée pendant la culture et au cours de l'essai est généralement de 16 heures (3), (7). Pour représenter fidèlement conditions naturelles à la surface du sédiment, l'intensité lumineuse est réglée à bas niveau (par exemple, 100-500 lx), et elle est mesurée au moins une fois pendant la période d'exposition. La température doit se situer à 20 °C ± 2 °C pendant tout l'essai. À chaque date de mesure, la température ne doit pas différer de plus de ± 1 °C entre les récipients de l'essai. Les récipients doivent être placés dans l'incubateur de l'essai ou la zone d'essai selon un modèle randomisé, afin de limiter le biais de reproduction dû à l'emplacement du récipient.

Aération

44. L'eau sus-jacente des récipients expérimentaux est soumise à une aération légère (par exemple, 2 - 4 bulles par seconde) à l'aide d'une pipette Pasteur placée environ 2 cm au-dessus de la surface du sédiment, pour en limiter les perturbations. Il conviendra de s'assurer que la concentration d'oxygène dissous ne chute pas en dessous de 30 % de sa valeur dans l'air saturé (VAS). L'apport d'air doit être contrôlé, et, le cas échéant, ajusté au moins quotidiennement les jours ouvrés.

Mesures de la qualité de l'eau

45. Les paramètres suivants caractérisant la qualité de l'eau doivent être mesurés dans l'eau sus-jacente:

Température:	au moins dans un récipient expérimental à chaque concentration et dans l'un des récipients des témoins une fois par semaine et au début et à la fin de la période d'exposition; si possible, la température dans le milieu environnant (air ambiant ou bain d'eau) est également enregistrée, par exemple, à intervalles d'une heure;

▼M6

Teneur en oxygène dissous:	au moins dans un récipient expérimental à chaque concentration et dans l'un des récipients des témoins une fois par semaine et au début et à la fin de la période d'exposition; exprimée en mg/l et % de VAS (valeur dans l'air saturé);
Apport d'air:	il doit être contrôlé au moins une fois par jour les jours ouvrés, et, le cas échéant, ajusté;
pH:	au moins dans un récipient expérimental à chaque concentration et dans l'un des récipients des témoins une fois par semaine et au début et à la fin de la période d'exposition;
Dureté totale de l'eau:	au moins dans l'un des témoins et dans un récipient expérimental à la concentration la plus élevée au début et à la fin de la période d'exposition; exprimée en mg/l de $CaCO_3$;
Teneur totale en ammoniac:	au moins dans l'un des récipients des témoins et dans un récipient expérimental à chaque concentration au début de la période d'exposition, et ensuite trois fois par semaine; exprimée en mg/l de NH_4+ ou de NH_3 ou en azote ammoniacal total.

Si la mesure des paramètres caractérisant la qualité de l'eau exige le prélèvement d'une quantité significative d'eau dans les récipients, il peut être préférable de préparer des récipients séparés pour les mesures de qualité de l'eau afin d'éviter de modifier le rapport volumique eau à sédiment.

Observations biologiques

46. Pendant l'exposition, la comparaison des récipients expérimentaux aux témoins permettra d'évaluer visuellement toutes les différences comportementales manifestées par les vers (par exemple, évitement du sédiment, granules fécaux visibles sur la surface du sédiment). Ces observations seront notées.

47. A la fin de l'essai, chaque récipient expérimental est examiné (les récipients supplémentaires destinés aux analyses chimiques peuvent être exclus de l'examen). Tous les vers du récipient expérimental sont récupérés par une méthode appropriée. On veillera à n'en endommager aucun. L'une des méthodes envisageable consiste à tamiser les vers dans le sédiment. A cet effet, on peut utiliser un tamis en acier inoxydable de taille de mailles appropriée. L'eau sus-jacente est décantée au maximum avec précaution, et le sédiment et l'eau résiduelle sont agités pour obtenir une suspension épaisse qui peut être tamisée. Sur des mailles de 500 µm, la majeure partie des particules de sédiment traverse le tamis très vite; le tamisage doit en effet être rapide afin d'éviter que les vers ne rampent dans le tamis, ni ne le traversent. Sur des mailles de 250 µm, les vers ne pourront pas s'échapper ainsi, mais il conviendra de s'assurer de retenir sur le tamis le moins possible de particules de sédiment. La suspension tamisée de chaque récipient peut être soumise à un second passage afin de garantir la récupération de la totalité des vers. Une autre méthode consiste à réchauffer le sédiment en plaçant les récipients expérimentaux dans un bain-marie à 50-60 °C; les vers sortent alors du sédiment et peuvent être recueillis à sa surface à l'aide d'une pipette à large ouverture polie au feu. Une autre méthode encore consiste à obtenir une suspension épaisse de sédiment et à la verser dans un bac peu profond de dimensions appropriées. Les vers sont ensuite prélevés dans la mince couche de suspension à l'aide d'une aiguille d'acier ou de pinces de bijoutier (il est préférable d'utiliser cet outil comme fourche plutôt que comme pinces pour éviter de blesser les vers) et les animaux sont transférés dans de l'eau pure. Après avoir été séparés de la suspension de sédiment, les vers sont rincés dans du milieu d'essai et comptés.

48. Quelle que soit la méthode utilisée, le laboratoire doit démontrer que son personnel parvient à récupérer en moyenne au moins 90 % des organismes

▼M6

dans le sédiment entier, par exemple, en ajoutant un certain nombre d'organismes d'essai au sédiment témoin ou à des sédiments expérimentaux et en déterminant leur récupération au bout de 1 h (7).

49. Le nombre total d'individus vivants et morts par expérience est noté et évalué. Les vers sont considérés morts s'ils appartiennent à l'un des groupes suivants:

a) aucune réaction n'est obtenue après un stimulus mécanique léger

b) des signes de décomposition sont observés (en combinaison avec «a»)

c) il manque un certain nombre de vers

De surcroît, les vers vivants peuvent être affectés à l'une des trois catégories suivantes:

a) gros vers complets (adultes) sans régions corporelles régénérées

b) vers complets comportant des régions corporelles régénérées de couleur plus claire (par exemple, dotés d'une nouvelle partie postérieure, d'une nouvelle partie antérieure ou des deux)

c) vers incomplets (c'est-à-dire vers récemment fragmentés dont certaines régions corporelles ne sont pas régénérées)

Ces observations complémentaires ne sont pas obligatoires, mais peuvent enrichir l'interprétation des résultats biologiques (par exemple, un nombre élevé de vers inclus dans la catégorie c peut indiquer un retard de reproduction ou de régénération induit par un traitement donné). De surcroît, si l'on observe entre les vers traités et témoins des différences d'apparence (par exemple lésion des phanères, sections du corps oedémateuses), il faut les noter.

50. Immédiatement après le comptage et l'évaluation, les vers vivants retrouvés dans chaque récipient expérimental sont transférés dans des plateaux de balance séchés, tarés et marqués (un par répétition), puis ils sont tués à l'aide d'une goutte d'éthanol par plateau. Les plateaux sont placés dans une étuve à 100 ± 5 °C pour un séchage d'une nuit, puis ils sont pesés après refroidissement dans un dessiccateur, et le poids sec des vers est déterminé (de préférence en grammes, au moins 4 chiffres après la virgule).

51. Outre le poids sec total, on peut déterminer le poids sec sans les cendres selon la description de (49) afin de prendre en compte les composants inorganiques issus du sédiment, ingérés et présents dans le tractus alimentaire des vers.

52. La biomasse déterminée est la biomasse totale par expérience identique, incluant les vers adultes et jeunes. Les vers morts n'entrent pas en ligne de compte dans cette détermination.

Vérification des concentrations de substance chimique d'essai

Prélèvement des échantillons

53. Il faut prélever des échantillons pour l'analyse chimique de la substance chimique d'essai au moins à la concentration la plus élevée et à une concentration inférieure, au moins à la fin de la phase d'équilibrage (avant l'addition des organismes de l'essai) et à la fin de l'essai. Il faut au moins analyser des échantillons prélevés dans la masse du sédiment et dans l'eau sus-jacente. Au moins deux échantillons doivent être prélevés par matrice et par traitement à chaque date de prélèvement. L'un des échantillons en double peut être stocké en réserve (puis analysé, par exemple, dans le cas où les résultats de l'analyse initiale sont en dehors de l'intervalle de ± 20 % de la concentration nominale). Si la substance chimique présente des

▼M6

propriétés spécifiques, par exemple, si sa dégradation rapide est à prévoir, le dispositif analytique doit être ajusté (par exemple, prélèvements plus fréquents, analyse d'un plus grand nombre de concentrations), en s'en remettant à l'avis d'un expert. Il est possible de prélever des échantillons à des dates intermédiaires (par exemple, sept jours après le début de l'exposition).

54. Il faut prélever les échantillons d'eau sus-jacente en décantant ou en siphonnant avec précaution l'eau de façon à perturber au minimum le sédiment. Le volume des échantillons doit être consigné.

55. Après retrait de l'eau sus-jacente, le sédiment doit être homogénéisé, puis transféré dans un récipient approprié. Le poids de l'échantillon de sédiment humide est noté.

56. Dans les cas où il est nécessaire d'analyser en sus la substance chimique d'essai dans l'eau interstitielle, les échantillons de sédiments homogénéisés et pesés sont centrifugés pour séparer cette eau. On peut par exemple introduire environ 200 ml de sédiment humide dans des béchers à centrifugation de 250 ml. Les échantillons sont ensuite centrifugés sans filtration afin d'isoler l'eau interstitielle, par exemple à 10 000 ± 600 × *g* pendant 30 - 60 min à une température inférieure ou égale à la température utilisée dans l'essai. Après centrifugation, le surnageant est décanté ou prélevé à la pipette en prenant soin de n'introduire aucune particule de sédiment, et son volume est noté. Le poids du culot de sédiment résiduel est également enregistré. Cette mesure peut contribuer à l'estimation du bilan massique ou de la récupération de la substance chimique d'essai dans le système eau-sédiment lorsque le poids sec du sédiment est déterminé à chaque date de prélèvement. Dans certains cas, il est impossible d'analyser les concentrations dans l'eau interstitielle, car le volume de l'échantillon est trop faible.

57. Si l'analyse n'est pas immédiate, il faut stocker tous les échantillons en suivant un protocole adéquat, par exemple dans des conditions de stockage recommandées pour une dégradation minimale de la substance chimique d'essai spécifique (par exemple, les échantillons prélevés dans l'environnement sont habituellement stockés à – 18 °C dans l'obscurité). Il convient d'obtenir des informations sur les conditions convenant à la substance chimique d'essai donnée — par exemple, durée et température de stockage, protocole d'extraction, etc. — avant le début de l'étude.

Méthode analytique

58. L'ensemble du protocole reposant essentiellement sur l'exactitude, la précision et la sensibilité de la méthode analytique utilisée sur la substance chimique d'essai, il faut vérifier expérimentalement que la précision et la reproductibilité de l'analyse chimique, ainsi que la récupération de la substance d'essai à partir de l'eau et des échantillons de sédiment, conviennent à la méthode particulière, au moins aux concentrations la plus élevée et la plus basse de l'essai. On vérifiera également que la substance chimique d'essai est indétectable dans les récipients témoins à des concentrations supérieures à la limite de quantification. S'il y a lieu, les concentrations nominales seront corrigées pour tenir compte des charges récupérées dans les témoins de contrôle de qualité (par exemple, si la récupération est en dehors de l'intervalle 80 - 120 % de la quantité introduite). Pendant toute la durée de l'essai, tous les échantillons sont manipulés de façon à réduire au minimum la contamination et les déperditions (par exemple, du fait de l'adsorption de la substance chimique d'essai sur le dispositif de prélèvement).

59. Il faut enregistrer et indiquer la récupération de la substance chimique d'essai, la limite de quantification et la limite de détection dans le sédiment et l'eau.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

60. Les principales variables de réponses de l'essai qu'il est impératif d'évaluer statistiquement sont la biomasse et le nombre total de vers par expérience. On peut également choisir d'évaluer la reproduction (augmentation des nombres de vers) et la croissance (augmentation de la biomasse sèche). Dans ce cas, il faut estimer le poids sec des vers au début de l'exposition, par exemple par mesure du poids sec d'une fraction d'échantillon représentative du lot des vers synchronisés utilisés dans l'essai.

▼M6

61. Même si la mortalité n'est pas l'un des résultats proprement dits de cet essai, il convient de l'évaluer dans la mesure du possible. À cet effet, sont considérés comme morts les vers qui ne réagissent pas à un stimulus mécanique léger ou qui présentent des signes de décomposition, ou les vers manquants. Les mortalités doivent être à tout le moins notées et prises en compte lors de l'interprétation des résultats de l'essai.

62. Les concentrations avec effet doivent être exprimées en mg/kg de poids sec de sédiments. Si 80 à 120 % des concentrations nominales de la substance chimique d'essai sont récupérés dans le sédiment, ou dans le sédiment et l'eau sus-jacente au début de l'exposition, les concentrations avec effet (CE_x, CSEO, CMEO) peuvent être rapportées aux concentrations nominales. Si le taux de récupération s'écarte des concentrations nominales de plus de ± 20 %, les concentrations avec effet (CE_x, CSEO, CMEO) sont rapportées aux concentrations initialement mesurées au début de l'exposition, par exemple en tenant compte du bilan massique de la substance chimique d'essai dans le système expérimental (voir paragraphe 30). Dans ce cas, des informations supplémentaires peuvent être tirées de l'analyse des solutions stocks ou des solutions d'application afin de confirmer que les sédiments de l'essai ont été préparés correctement.

CE_x

63. Les valeurs CE_x relatives aux paramètres décrits au paragraphe 60 sont calculées par des méthodes statistiques adéquates (par exemple analyse par la méthode des probits, fonction logistique ou de Weibull, méthode abrégée de Spearman-Karber, ou interpolation simple). Des informations sur l'évaluation statistique sont présentées dans (15) et (50). Une CE_x est calculée en incorporant une valeur correspondant à x % de la valeur du témoin dans l'équation. Le calcul de la CE_{50} ou de toute autre CE_x, implique la soumission des moyennes par traitement ($\overline{X}$) à une analyse de régression.

CSEO/CMEO

64. Dans le cas d'une analyse statistique visant à déterminer la CSEO ou la CMEO, il est nécessaire d'appliquer une analyse statistique par récipient (les récipients individuels sont considérés comme des répétitions). Il convient d'utiliser des méthodes statistiques adéquates. En général, les effets indésirables de la substance d'essai, relativement au témoin, sont étudiés en utilisant une vérification de l'hypothèse unilatérale (plus faible) à $p < 0,05$. Des exemples sont présentés dans les paragraphes suivants. On trouvera des renseignements sur le choix des méthodes statistiques appropriées dans (15) et (50).

65. La distribution normale des données peut être analysée, par exemple, par le test de validité de l'ajustement de Kolmogorov-Smirnov, le test du rapport intervalle à écart-type (test R/s) ou le test de Shapiro-Wilk (bilatéral, $p \leq 0,05$). Le test de Cochran, le test de Levene ou le test de Bartlett (bilatéral, $p \leq 0,05$) peuvent être utilisés pour analyser l'homogénéité de la variance. Lorsque les prérequis des protocoles de tests paramétriques (normalité, homogénéité de la variance) sont satisfaits, une analyse de la variance à un facteur (ANOVA), puis des tests multi-comparaisons peuvent être appliqués. Des comparaisons par paires (par exemple, test-t de Dunnett) ou des tests d'analyse de tendance descendante (par exemple test de William) peuvent permettre de calculer d'éventuelles différences significatives ($p \leq 0,05$) entre les témoins et les diverses concentrations de substance d'essai. Dans le cas contraire, des méthodes non paramétriques (test U de Bonferroni selon Holm ou test de tendance de Jonckheere-Terpstra) permettront le calcul de la CSEO et de la CMEO.

Essai limite

66. Lorsqu'un essai limite (comparaison du témoin et d'un seul traitement) a été effectué et que les prérequis des protocoles de test paramétrique (normalité, homogénéité) sont satisfaits, on peut évaluer les réponses métriques (nombre total de vers et biomasse en poids sec de vers) par le test de Student (test-t). Le test t avec variance inégale (test t de Welch) ou un test non paramétrique, tel que le test U de MannWhitney peut être utilisé lorsque ces conditions ne sont pas remplies. L'Appendice 6 fournit des informations sur la puissance statistique déterminée au cours de la vérification de l'hypothèse dans l'essai circulaire de la méthode.

▼M6

67. La détermination des différences significatives entre les témoins (témoin et témoin de solvant) peut faire appel à l'analyse de plusieurs expériences identiques pour chaque témoin comme il est décrit pour l'essai limite. S'il n'est détecté aucune différence significative, toutes les expériences identiques témoins et témoins de solvant peuvent être réunies. Si ce n'est pas le cas, tous les traitements doivent être comparés avec le témoin de solvant.

Interprétation des résultats

68. Les résultats doivent être interprétés avec prudence lorsque l'essai s'écarte de la présente méthode d'essai, et lorsque les concentrations mesurées de l'essai approchent la limite de détection de la méthode analytique utilisée. Tout écart par rapport à cette méthode d'essai doit être noté.

Rapport d'essai

69. Le rapport d'essai comprend au moins les informations suivantes:

— *Substance chimique d'essai:*

— données permettant l'identification chimique (nom courant, nom chimique, formule structurelle, numéro CAS, etc.), notamment pureté et méthode analytique de quantification de la substance chimique d'essai; source de la substance d'essai, identité et concentration de tous les solvants utilisés.

— toutes les informations disponibles sur la nature physique et les propriétés physico-chimiques recueillies antérieurement au début de l'essai (par exemple, solubilité dans l'eau, pression de vapeur, coefficient de partage dans le sol (ou dans le sédiment si possible), log K_{oe}, stabilité dans l'eau, etc.);

— *Espèce expérimentale:*

— nom scientifique, source, toutes les conditions de prétraitement, d'acclimatation, de culture, etc.

— *Conditions expérimentales:*

— protocole d'essai utilisé (par exemple, statique, semi-statique ou à écoulement continu);

— modèle de l'essai (par exemple, nombre, matière et dimensions des récipients d'essai, volume d'eau par récipient, masse et volume de sédiment par récipient (pour les protocoles à écoulement continu ou semi-statique: vitesse de remplacement du volume d'eau), toute aération utilisée avant et pendant l'essai, nombre d'expériences identiques, nombre de vers par expérience au début de l'exposition, nombre de concentrations de l'essai, durée du conditionnement, périodes d'équilibrage et d'exposition, des prélèvements);

— profondeur du sédiment et de l'eau sus-jacente;

— méthode de prétraitement de la substance chimique d'essai et charge/application;

— concentrations nominales de l'essai, précisions sur le prélèvement des échantillons destinés à l'analyse chimique, et sur les méthodes analytiques de détermination des concentrations de la substance chimique d'essai;

— caractéristiques du sédiment, selon la description des paragraphes 24 - 25, et toute autre mesure; préparation du sédiment formulé;

— préparation de l'eau de l'essai (dans le cas où l'on utilise de l'eau reconstituée) et ses caractéristiques (concentration d'oxygène, pH, conductivité, dureté, et toute autre mesure réalisée) avant le début de l'essai;

— précisions sur l'alimentation, notamment le type d'aliments, leur préparation, leur quantité et le régime alimentaire;

▼M6

— intensité lumineuse et photopériodes;

— méthodes utilisées pour la détermination de tous les paramètres biologiques (par exemple prélèvements d'échantillons, examen, pesée des organismes expérimentaux), et de tous les paramètres abiotiques (par exemple, paramètres de qualité de l'eau et du sédiment);

— volumes et/ou poids de tous les échantillons destinés à l'analyse chimique;

— information détaillée sur le traitement de tous les échantillons destinés à l'analyse chimique, notamment précisions sur la préparation, le stockage, les protocoles de charge, l'extraction et les protocoles analytiques (et leur précision) concernant la substance chimique d'essai, et récupérations de la substance chimique d'essai.

— *Résultats:*

— qualité de l'eau dans les récipients expérimentaux (pH, température, concentration d'oxygène dissous, dureté, concentration d'ammoniac et toute autre mesure réalisée);

— teneur en carbone organique total (COT), rapport poids sec à poids frais, pH du sédiment et toute autre mesure réalisée;

— nombre total, et s'il a été déterminé, nombre de vers complets et incomplets dans chaque récipient expérimental à la fin de l'essai;

— poids sec des vers dans chaque récipient à la fin de l'essai, et, le cas échéant, poids sec d'une fraction des vers au début de l'essai;

— tout comportement anormal observé par rapport aux témoins (par exemple, évitement du sédiment, présence ou absence de granules fécaux);

— toute mortalité observée;

— estimations des effets toxiques (par exemple, CE_x, CSEO et/ou CMEO), et méthodes statistiques utilisées pour leur détermination;

— concentrations nominales de l'essai, concentrations mesurées de l'essai et résultats de toutes les analyses effectuées pour déterminer la concentration de la substance chimique d'essai dans les récipients expérimentaux;

— tout écart par rapport aux critères de la validité.

— *Evaluation des résultats:*

— conformité des résultats aux critères de validité indiqués dans le paragraphe 13;

— discussion des résultats, notamment sur une influence éventuelle sur les résultats de l'essai de modifications apportées à la présente méthode d'essai.

BIBLIOGRAPHIE

(1) EC (2003). Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I — IV. Office for Official Publications of the EC (European Commission), Luxembourg.

(2) OCDE (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), Paris.

▼**M6**

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment- Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. et Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(6) Chapitre C.27 de la présente annexe, «Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau-sédiment dopé».

(7) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment- associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(8) Environnement Canada (1997). Essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (*Chironomus tentans* ou *Chironomus riparius*) dans les sédiments. Méthode d'essai biologique. Rapport SPE 1/RM/32. Decembre 1997.

(9) Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (eds), 1993, Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8-10 November 1993, Renesse (NL).

(10) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

(11) Riedhammer C. & B. Schwarz-Schulz (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. J. Soils Sediments 1(2), 105-110.

(12) ASTM International (2004). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1391-03.

(13) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(14) OCDE (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(15) Environnement Canada (2003). Document d'orientation sur les methodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité; première version, mars 2003; Rapport EPS 1/RM/

(16) Nikkilä A., Halme A., Kukkonen J.V.K. (2003). Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. Chemosphere 51: 35-46.

(17) Baily H.C., & Liu D.H.W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. p. 205-215. In J.C. Eaton, P.R. Parrish, and A.C. Hendricks (eds). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.

▼**M6**

(18) Chapman K. K., Benton M. J., Brinkhurst R. O. & Scheuerman P. R. (1999). Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. Environmental Toxicology. 14(2): 271-278.

(19) Meyer J.S., Boese C.J. & Collyard S.A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. Comp. Biochem. Physiol. Part C 133:99-109.

(20) Schubauer-Berigan M.K., Dierkes J.R., Monson P.D. & Ankley G.T. (1993). pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxciol. Chem. 12(7):1261-1266.

(21) West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps & G.T. Ankley (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. Hydrobiol. 262:57-63.

(22) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.

(23) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(24) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(25) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(26) Landrum, P.F., Gedeon, M.L., Burton, G.A., Greenberg. M.S., & Rowland, C.D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42: 292-302.

(27) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(28) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.

(29) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(30) Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J., & Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of ^{14}C-17α-ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. Chemosphere 59, 271-280.

(31) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000-2007.

(32) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

▼**M6**

(33) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

(34) Dermott R. & Munawar M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 235/236: 407-414.

(35) Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.

(36) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(37) Chapitre C.1 de la présente annexe, Toxicité aiguë vis-à-vis des poissons.

(38) OCDE (1992c). Ligne directrice pour les essais de produits chimiques. No. 210: poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie OCDE, Paris.

(39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.

(40) Meller, M., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel and B. Streit. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety, 39, 10-20.

(41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on «Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes», 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(42) Suedel, B.C. et Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.

(43) Naylor, C. et C. Rodrigues. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(44) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. Hydrobiologia 11, 181184.

(45) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111-124.

(46) Environnement Canada (1995). Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité sur sédiments de contrôle dopés avec un produit toxique de référence. Environmental Protection Series Rapport EPS 1/RM/30.

(47) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Technol. 23, 588-595.

(48) Brooke, L.T., Ankley, G.T., Call, D.J. & Cook, P.M. (1996). Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates. Environ. Toxicol. Chem. 15, 223-228.

(49) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.

▼M6

(50) OCDE 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OCDE, Paris, France.

(51) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Allemagne. pp. 107-119.

Références complémentaires sur les protocoles statistiques:

Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.

Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction: Environ. Sci. Technol. 12 (1998), 417.

Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

Sokal, R.R. et F.J. Rohlf. (1981) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

Miller, R.G., Jr. (1986). Beyond ANOVA, basics of applied statistics. John Wiley & Sons. New York.

Shapiro S.S. & Wilk M.B (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52: 591-611.

Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519 531.

▼M6

Appendice 1

Définitions

Aux fins de la présente méthode d'essai, les définitions suivantes sont utilisées:

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Période de conditionnement: période employée pour stabiliser le composant microbien du sédiment et éliminer, par exemple, l'ammoniac issu des composants du sédiment; elle se déroule avant l'introduction dans le sédiment de la substance chimique d'essai. Habituellement, on élimine l'eau sus-jacente après conditionnement.

CE_x: concentration de substance chimique d'essai dans le sédiment qui provoque un effet de X % (par exemple 50 %) sur un paramètre biologique après une durée d'exposition donnée.

Période d'équilibrage: période utilisée pour que la substance chimique d'essai se répartisse entre la phase solide, l'eau interstitielle et l'eau sus-jacente; elle se déroule après l'introduction dans le sédiment de la substance chimique d'essai et avant l'addition des organismes expérimentaux.

Phase d'exposition: durée pendant laquelle les organismes expérimentaux sont exposés à la substance chimique d'essai.

Sédiment formulé ou sédiment reconstitué, artificiel ou synthétique: mélange de matériaux employés pour simuler les composants physiques d'un sédiment naturel.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): la concentration la plus faible analysée d'une substance chimique d'essai à laquelle on a observé un effet toxique significatif de la substance (à $p \leq 0,05$) par rapport au témoin. Toutefois, toutes les concentrations de l'essai supérieures à la CMEO doivent présenter un effet égal ou supérieur à celui de la CMEO. Si ces deux conditions ne sont pas satisfaites, une explication exhaustive doit justifier le choix de la CMEO (et par conséquent de la CSEO).

Concentration sans effet observé (CSEO): la concentration de l'essai immédiatement inférieure à la CMEO qui, si on se réfère au témoin, ne présente aucun effet statistiquement significatif ($p \leq 0,05$), après une exposition pendant une période donnée.

Coefficient de partage octanol-eau (K_{oe}, parfois exprimé par P_{oe}): rapport de la solubilité d'une substance dans le n-octanol et dans l'eau à l'équilibre; correspond à la lipophilie d'une substance (Chapitre A.24 de la présente annexe). Le K_{oe} ou le logarithme de K_{oe} ($\log K_{oe}$) sert d'indicateur de la bioaccumulation d'une substance par des organismes aquatiques.

Coefficient de partage carbone organique-eau (K_{co}): rapport de la concentration d'une substance chimique dans/sur la fraction de carbone organique d'un sédiment et de la concentration de substance dans l'eau à l'équilibre.

Eau sus-jacente: l'eau qui recouvre le sédiment dans le récipient expérimental.

Eau intertitielle: l'eau qui occupe les espaces entre les particules de sédiment ou de sol.

Sédiment chargé: sédiment auquel a été ajoutée la substance chimique d'essai.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼**M6**

Appendice 2

Composition de l'eau reconstituée recommandée

[Adapté du chapitre C.1 de la présente annexe (1)]

a) *Solution de chlorure de calcium*

Dissoudre 11,76 g de $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ dans de l'eau désionisée; ajuster à 1 l avec de l'eau désionisée

b) *Solution de sulfate de magnésium*

Dissoudre 4,93 g de $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ dans de l'eau désionisée; ajuster à 1 l avec de l'eau désionisée

c) *Solution de bicarbonate de sodium*

Dissoudre 2,59 g de$NaHCO_3$ dans de l'eau désionisée; ajuster à 1 l avec de l'eau désionisée

d) *Solution de chlorure de potassium*

Dissoudre 0,23 g de KCl dans de l'eau désionisée; ajuster à 1 l avec de l'eau désionisée

Tous les produits chimiques doivent être de qualité analytique.

La conductivité de l'eau distillée ou désionisée ne doit pas excéder 10 μScm^{-1}.

On mélange de 25 ml de chaque solution de (a) à (d) et on ajuste le volume total à 1 l avec de l'eau désionisée. La somme des concentrations d'ions calcium et magnésium dans ces solutions est égale à 2,5 mmol/l.

La proportion d'ions Ca:Mg est égale à 4:1 et celle des ions Na:K 10:1. La capacité acide $K_{S4.3}$ de cette solution est égale à 0,8 mmol/l.

Aérer l'eau de dilution jusqu'à obtenir une saturation en oxygène, puis la stocker pendant environ 2 jours sans autre aération avant utilisation.

RÉFÉRENCE

1). Chapitre C.1 de la présente annexe, Toxicité aiguë vis-à-vis des poissons.

▼**M6**

Appendice 3

Caractéristiques physiques et chimiques d'une eau de dilution admissible

Constituant	Concentrations
Matières particulaires	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 µg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	< 50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux plus biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l
[Adapté de OCDE 1992 (1)]	

RÉFÉRENCE

(1) OCDE (1992) Ligne directrice pour les essais de produits chimiques N° 210: poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie OCDE, Paris.

▼M6

Appendice 4

Sédiment artificiel recommandé — prescriptions pour la préparation et le stockage

Constituants du sédiment

Constituant	Caractéristiques	% de poids sec de sédiment
Tourbe	Tourbe à sphaignes, degré de décomposition: «moyen», séchée à l'air, aucun résidu végétal visible, finement broyée (taille de particule ≤ 0,5 mm)	5 ± 0,5
Sable quartzique	Dimension des particules: ≤ 2 mm, mais > 50 % des particules doivent mesurer entre 50 et 200 µm	75 - 76
Argile kaolinite	Taux de kaolinite ≥ 30 %	20 ± 1
Source d'aliment	par exemple, poudre d'Urtica (Folia urticae), feuilles d'Urtica dioica (ortie), finement broyées (taille des particules ≤ 0,5 mm); conformes aux normes pharmaceutiques pour la consommation humaine; additionnées au sédiment sec	0,4 - 0,5 %
Carbone organique	Ajusté par addition de tourbe et de sable	2 ± 0,5
Carbonate de calcium	$CaCO_3$, pulvérisé, chimiquement pur, ajouté au sédiment sec	0,05 - 1
Eau désionisée	Conductivité ≤ 10 µS/cm, ajoutée au sédiment sec	30 - 50

Note: si des concentrations élevées d'ammoniac sont à prévoir, par exemple, s'il est notoire que la substance chimique d'essai inhibe la nitrification, il peut utile de remplacer 50 % de la poudre d'orties riche en azote par de la cellulose [par exemple poudre d'α-cellulose, chimiquement pure, taille de particules ≤ 0,5 mm; (1) (2)].

Préparation

La tourbe est séchée à l'air et broyée en une fine poudre. Une suspension de la quantité requise de poudre de tourbe dans de l'eau désionisée est préparée à l'aide d'un dispositif d'homogénéisation à haute performance. Le pH de cette suspension est ajusté à 5,5 ± 0,5 avec du $CaCO_3$. La suspension est conditionnée pendant au moins deux jours sous agitation douce, à 20 ± 2 °C, afin de stabiliser le pH et d'établir une flore microbienne stable. Le pH est à nouveau mesuré et doit alors être égal à 6,0 ± 0,5. Ensuite, la suspension de tourbe est mélangée avec les autres constituants (sable et argile kaolinique) et de l'eau désionisée afin d'obtenir un sédiment homogène dont la teneur en eau est comprise dans l'intervalle de 30 à 50 % de poids sec du sédiment. Le pH du mélange final est à nouveau mesuré et ajusté entre 6,5 et 7,5 avec du $CaCO_3$, s'il y a lieu. Néanmoins, si l'on prévoit un dégagement d'ammoniac, il peut être utile de maintenir le pH du sédiment en dessous de 7,0 (par exemple, entre 6,0 et 6,5). On prélève des échantillons de sédiment afin d'en déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique. Si l'on prévoit un dégagement d'ammoniac, le sédiment formulé peut être conditionné pendant sept jours dans les conditions appliquées dans l'essai consécutif (par exemple, rapport sédiment-eau 1:4, profondeur de la couche de sédiment identique à celle introduite dans les récipients expérimentaux) avant d'y introduire la substance chimique d'essai, c'est-à-dire qu'il doit être

▼M6

recouvert d'eau impérativement aérée. À la fin de la période de conditionnement, l'eau sus-jacente doit être retirée et jetée. On mélange ensuite le sable quartzique chargé avec le sédiment pour chaque dose de traitement, on répartit le sédiment dans les récipients expérimentaux pour expériences identiques, et on les recouvre de l'eau de l'essai. Les récipients sont ensuite incubés dans les conditions appliquées dans l'essai consécutif. Cet événement marque le début de la période d'équilibrage. L'eau sus-jacente doit être aérée.

La source d'aliments choisie doit être ajoutée avant ou pendant l'introduction de la substance chimique d'essai dans le sédiment. On peut la mélanger préalablement avec la suspension de tourbe (voir ci-dessus). Toutefois, une dégradation trop importante de la source d'aliments avant l'addition des organismes expérimentaux — par exemple, dans le cas d'une longue durée d'équilibrage — peut être évitée en réduisant autant que possible la période qui s'écoule entre l'addition des aliments et le début de l'exposition. Pour garantir la charge des aliments par le composé d'essai, il convient de mélanger la source d'aliment avec le sédiment au plus tard le jour de l'introduction de la substance chimique d'essai dans le sédiment.

Stockage

Les constituants secs du sédiment artificiel peuvent être stockés dans un endroit sec et frais ou à température ambiante. Le sédiment préparé chargé de la substance chimique d'essai est de préférence utilisé immédiatement dans l'essai. Les échantillons de sédiment chargés peuvent être stockés dans les conditions recommandées pour la substance d'essai particulière jusqu'à analyse.

RÉFÉRENCES

(1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(2) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Allemagne. pp. 107-119.

▼M6

Appendice 5

Méthodes de culture de lumbriculus variegatus

Lumbriculus variegatus (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochete vit dans les sédiments d'eau douce et est largement utilisé dans les essais écotoxicologiques. Il est facile à cultiver en conditions de laboratoire. Une description générale des méthodes de culture est donnée dans les paragraphes suivants.

Méthodes de culture

Les conditions de culture de L*umbriculus variegatus* sont détaillées dans Phipps et al. (1993) (1), Brunson et al. (1998) (2), ASTM (2000) (3), U.S. EPA (2000) (4). Un bref résumé de ces conditions est présenté ci- dessous. Le principal avantage de *L. variegatus* est sa reproduction rapide, qui permet une augmentation rapide de la biomasse dans les populations cultivées au laboratoire [par exemple (1), (3), (4), (5)].

Les vers peuvent être cultivés dans de grands aquariums (57 — 80 l) à 23 °C avec une photopériode de 16 h de lumière (100 — 1 000 lx) et 8 h d'obscurité en renouvelant quotidiennement l'eau naturelle (45 - 50 l par aquarium). Le substrat est préparé en découpant en bandes des serviettes en papier gris non blanchi qui peuvent ensuite être mélangées avec l'eau de culture pendant quelques secondes pour donner des petits morceaux de substrat de papier. Ce substrat peut ensuite être directement utilisé pour recouvrir le fond du réservoir de l'aquarium de culture de *Lumbriculus*, ou il peut être stocké congelé dans de l'eau désionisée pour une utilisation ultérieure. Chaque nouvel apport de substrat dans le réservoir dure généralement environ deux mois.

On démarre chaque culture de vers avec 500 — 1 000 vers, que l'on nourrit par une suspension de 10 ml contenant 6 g d'aliment de culture de départ pour truites 3 fois par semaine dans des conditions de renouvellement ou d'écoulement de l'eau. Si les cultures sont statiques ou semi-statiques, il faut réduire les vitesses d'alimentation pour prévenir la croissance bactérienne et fongique.

Dans ces conditions, le nombre d'individus dans la culture double habituellement en environ 10 à 14 jours.

Il est également possible de cultiver *Lumbriculus variegatus* dans un système constitué d'une couche de sable quartzique employé pour le sédiment artificiel (1 - 2 cm de profondeur) additionnée d'eau reconstituée. On peut utiliser comme récipient de culture des conteneurs en verre ou en acier inoxydable de 12 à 20 cm de haut. L'eau doit être légèrement aérée (par exemple, 2 bulles par seconde) par l'intermédiaire d'une pipette Pasteur placée environ 2 cm au-dessus de la surface du sédiment. Afin d'éviter toute accumulation, d'ammoniac par exemple, il convient d'échanger l'eau sus-jacente à l'aide d'un système à écoulement continu, ou bien au moins une fois par semaine manuellement. Les oligochetes peuvent être cultivés à température ambiante avec une photopériode de 16 heures de lumière (intensité 100 – 1 000 lx) et 8 heures d'obscurité. Dans le cas d'une culture semi-statique (renouvellement de l'eau une fois par semaine), les vers sont nourris de TetraMine deux fois par semaine (par exemple, 0,6 - 0,8 mg par cm^2 de surface de sédiment), aliment qui peut être fourni sous forme d'une suspension de 50 mg de TetraMine par ml d'eau désionisée.

Lumbriculus variegatus peut être prélevé dans des cultures, par exemple par transfert dans un nouveau bécher du substrat avec un filet à mailles fines ou transfert des organismes à l'aide d'une pipette en verre à large ouverture (environ 5 mm de diamètre) polie au feu. Lorsque du substrat est transféré en même temps dans ce bécher, le récipient contenant les vers et le substrat est placé une nuit dans des conditions d'écoulement continu, qui permettront l'élimination du substrat, tout en laissant les vers au fond du récipient. On peut ensuite les introduire dans des réservoirs de culture préparés extemporanément ou les traiter ensuite pour l'essai comme il est décrit dans (3) et (4) ou dans les paragraphes suivants.

Il convient de considérer avec attention le mode de reproduction de *L. variegatus* dans les essais sur sédiment lorsqu'on utilise cet animal (architomie ou morphallaxie, par exemple (6)). Ce mode de reproduction asexuée produit deux fragments, qui ne s'alimentent plus pendant un certain temps jusqu'à ce que les segments de tête et de queue se régénèrent (par exemple, (7) (8)). Par conséquent, l'exposition de *L. variegatus* par ingestion de sédiment contaminé n'est pas un processus continu.

▼**M6**

Par conséquent, il convient de procéder à une synchronisation pour réduire au minimum la reproduction et la régénération incontrôlées, source de variation élevée dans les résultats de l'essai. Cette variation peut découler d'une moindre exposition à la substance chimique d'essai de certains individus qui se sont fragmentés et ne se sont par conséquent pas alimentés pendant une certaine période de temps, alors que d'autres individus ne se sont pas fragmentés pendant l'essai (9), (10), (11). Dix à 14 jours avant le début de l'exposition, les vers doivent être artificiellement fragmentés (synchronisation). Il faut choisir pour la synchronisation des gros vers (adultes), qui, de préférence, ne présentent aucun signe de morphallaxie récente. Ces vers sont placés sur une lame de verre dans une goutte d'eau de culture, et la région corporelle médiane est disséquée au scalpel. On s'assurera que les extrémités postérieures sont de tailles similaires. Les extrémités postérieures régénèrent ensuite de nouvelles têtes dans un récipient de culture contenant le substrat utilisé dans la culture et de l'eau reconstituée, jusqu'au début de l'exposition. La régénération de nouvelles têtes est signalée par l'enfouissement des vers synchronisés dans le substrat (la présence de têtes régénérées peut être confirmée par l'examen d'une fraction d'échantillon représentative au microscope binoculaire). On estime alors que les organismes expérimentaux sont tous dans un état physiologique similaire, c'est-à-dire que lorsqu'une reproduction par morphallaxie a lieu chez des vers synchronisés pendant l'essai, on estime que pratiquement tous les animaux sont également exposés au sédiment chargé. Les vers synchronisés doivent être alimentés une fois dès que les vers commencent à s'enfouir dans le substrat, ou 7 jours après la dissection. Le régime alimentaire doit être comparable à celui des cultures normales, mais il est préférable d'alimenter les vers synchronisés par la même source d'aliments que celle utilisée dans l'essai. Les vers doivent être maintenus à une température d'essai à 20 ± 2 °C. Après régénération, les vers complets intacts, qui nagent ou rampent activement après un léger stimulus mécanique, sont utilisés dans l'essai. Il convient de prévenir les lésions ou l'autotomie des vers, par exemple, en utilisant pour les manipuler des pipettes à bords polis au feu et ou des cure-dents en acier inoxydable.

Sources de cultures de départ de Lumbriculus variegatus [adresses aux États-Unis issues de (4)]

Europe

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Allemagne

Bayer Crop Science AG
Development — Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Allemagne

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finlande

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydro-wissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresden
Allemagne

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

U.S.A.

Agence de protection de l'environnement des États-Unis
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Université d'état du Michigan
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

▼**M6**

Agence de protection de l'environnement des États-Unis
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Université d'état de Wright
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 4543

Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201

Great Lakes Environmental Research Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

RÉFÉRENCES

(1) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. et Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(2) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field- collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment- associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(5) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(6) Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, Lumbriculus variegatus: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.

(7) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(8) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(9) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and Lumbriculus variegatus in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000-2007.

(10) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with Lumbriculus variegatus and Chironomus riparius and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG- AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

(11) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

▼M6

Appendice 6

Synthèse des résultats de l'essai circulaire

Essai de toxicité du sédiment avec *«Lumbriculus variegatus»*

Tableau 1

Résultats des cycles individuels de l'essai circulaire: nombres moyens de vers dans les témoins et les témoins de solvant à la fin de l'essai; EC = écart type; EC = écart type; CV = coefficient de variation.

	nombre moyen de versdans les témoins	EC	CV (%)	n	nombre moyen de versdans les témoins de solvant	EC	CV (%)	n
	32,3	7,37	22,80	3	**39,0**	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	**36,0**	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	**38,5**	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	**30,8**	6,70	21,80	4
	24,3	10,69	43,94	3	**26,3**	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	**30,7**	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	**28,8**	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	**27,7**	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	**21,3**	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	**35,0**	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	**33,5**	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	**15,0**	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	**43,7**	0,58	1,32	3
	18,2	3,60	19,82	6	**21,7**	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	**31,3**	4,79	15,32	4
Moyenne interlaboratoire	**29,59**		**20,10**		**30,61**		**13,26**	
EC	**8,32**		**10,03**		**7,57**		**10,48**	
n	**15**				**15**			
min	**16,3**				**15,0**			
max	**42,0**				**43,7**			
CV (%)	**28,1**				**24,7**			

▼**M6**

Tableau 2

Résultats des cycles individuels de l'essai circulaire: poids sec moyen total des vers par expérience dans les témoins et les témoins de solvant à la fin de l'essai; EC = écart type; CV = coeff. de variation.

	poids sec total des vers par expérience (témoins)	EC	CV (%)	n	poids sec total des vers par expérience (témoins de solvant)	EC	CV (%)	n
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	22,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6
	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4
Moyenne interlaboratoire	**25,15**		**20,36**		**27,68**		**17,53**	
EC	**7,87**		**12,56**		**7,41**		**9,10**	
n	**15**				**15**			
min	**12,9**				**10,5**			
max	**41,3**				**41,4**			
CV (%)	**31,3**				**26,8**			

▼M6

Tableau 3

Toxicité du PCP: résumé des effets dans l'essai circulaire: moyennes interlaboratoire pour la CE50, la CSEO et la CMEO; EC = écart type; CV = coefficient de variation. moyenne

paramètre biologique		Moyenne interlaboratoire (mg/kg)	min	max	Facteur interlaboratoire	EC	CV (%)	Moyenne géométr. (mg/kg)
nombre total de vers total	**CE_{50}**	**23,0**	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	CSEO	**9,9**	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	CMEO	**27,9**	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	DDM (%)	**22,5**	7,1	39,1				
poids sec total des vers	**CE_{50}**	**20,4**	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	CSEO	**9,3**	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	CMEO	**25,7**	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	DDM (%)	**24,8**	10,9	44,7				
mortalité/ survie	**CE_{50}.**	**25,3**	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	CSEO	**16,5**	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	CMEO	**39,1**	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
reproduction (augmentation du nombre de vers par expérience)	**CE_{50}**	**20,0**	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	CSEO	**7,9**	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	CMEO	**22,5**	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	DDM (%)	**29,7**	13,9	47,9				
croissance (augmentation de biomasse par expérience)	**CE_{50}**	**15,3**	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	CSEO	**8,7**	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	CMEO	**24,0**	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	DDM (%)	**32,2**	13,6	65,2				

DDM: différence détectable minimale par rapport aux valeurs des témoins lors de la vérification de l'hypothèse; utilisée comme mesure de la puissance statistique

RÉFÉRENCE

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

▼M6

C.36. ESSAI DE REPRODUCTION D'UN ACARIEN PRÉDATEUR [*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*] DANS LE SOL

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 226 (2008) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Cette méthode d'essai est conçue pour évaluer les effets de substances chimiques contenues dans le sol sur le taux de reproduction d'une espèce d'acarien du sol *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae), et permet donc d'estimer l'inhibition de la vitesse de croissance spécifique d'une population (1,2). Le taux de reproduction désigne ici le nombre de juvéniles à la fin de la période d'essai. *H. aculeifer* ajoute un niveau trophique aux espèces déjà représentées dans des méthodes d'essai. Un essai de reproduction sans discrimination ni quantification des différentes étapes du cycle de la reproduction est jugé approprié aux desseins de cette méthode d'essai. Pour les substances chimiques dont le mode d'exposition n'implique pas le sol, d'autres approches devraient mieux convenir (3).

2. *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* est considéré comme dûment représentatif de la faune du sol, et des acariens prédateurs en particulier. Il est répandu dans le monde entier (5) et sa récolte et son élevage au laboratoire sont aisés. L'Appendice 7 propose un résumé de la biologie de *H. aculeifer*. Des informations de référence sur l'écologie des espèces d'acariens et sur leur utilisation dans les essais d'écotoxicité apparaissent dans (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

PRINCIPE DE L'ESSAI

3. Des adultes femelles sont exposées à une série de concentrations de la substance chimique d'essai mélangée au sol. Au début de l'essai, 10 femelles adultes sont placées dans chaque récipient expérimental. Les mâles ne sont pas inclus dans l'essai, car l'expérience montre que les femelles s'accouplent dès l'éclosion du stade deutonymphe ou peu après dès lors que des mâles sont présents. De surcroît, l'inclusion de mâles exigerait une discrimination laborieuse des stades de développement, avec pour effet de prolonger l'essai. Par conséquent, l'accouplement lui-même reste hors de l'essai. Les femelles sont introduites dans l'essai 28 à 35 jours après le début de la période de ponte dans le processus de synchronisation (voir Appendice 4), car on peut alors considérer que les femelles se sont déjà accouplées et ont dépassé le stade de la préoviposition. À 20 °C, l'essai s'achève le 14e jour après l'introduction des femelles (jour 0), durée qui permet aux premiers descendants dans les témoins d'atteindre le stade de la deutonymphe (voir Appendice 4). Le nombre de juvéniles par récipient expérimental ainsi que le nombre de femelles survivantes sont déterminés pour calculer la principale variable mesurée. Le taux de reproduction des mites exposées à la substance chimique d'essai est comparé à celui des témoins, afin de déterminer la CE_x (par exemple CE_{10}, CE_{50}) ou la concentration sans effet observé (CSEO) (voir Appendice 1 pour les définitions), selon le modèle expérimental choisi (voir paragraphe 29). Une description générale du calendrier de l'essai est proposée dans l'Appendice 8.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE CHIMIQUE D'ESSAI

4. Il est préférable de connaître l'hydrosolubilité, le log K_{oe}, le coefficient de partage entre l'eau et le sol et la pression de vapeur de la substance chimique d'essai. Des informations complémentaires sur le devenir de la substance d'essai dans le sol, notamment sa vitesse de dégradation biotique et abiotique, sont souhaitables.

5. La présente méthode d'essai peut être utilisée pour des substances chimiques hydrosolubles ou insolubles dans l'eau; néanmoins, le mode d'application de la substance chimique d'essai variera en conséquence. Cette méthode d'essai ne s'applique pas aux substances volatiles, à savoir les substances dont la constante de Henry ou le coefficient de partage air/eau sont supérieurs à un, ou les substances dont la pression de vapeur dépasse 0,0133 Pa à 25 °C.

▼M6

VALIDITÉ DE L'ESSAI

6. Un résultat de l'essai sera considéré comme valide si les témoins non traités répondent aux critères suivants:

— La mortalité moyenne des femelles adultes ne dépasse pas 20 % à la fin de l'essai;

— Le nombre moyen de juvéniles par expérience (10 femelles adultes introduites) est égal à au moins 50 à la fin de l'essai;

— Le coefficient de variation calculé pour le nombre d'acariens juvéniles par expérience n'excède pas 30 % à l'achèvement de l'essai final.

SUBSTANCE CHIMIQUE DE RÉFÉRENCE

7. Le calcul de la CE_x et/ou de la CSEO d'une substance chimique de référence garantit l'adéquation des conditions expérimentales du laboratoire et contrôle la régularité de la réaction des organismes d'expérience au cours du temps. Le diméthoate (CAS 60-51-5) est une substance chimique de référence reconnue dont l'effet sur la taille de la population est démontré (4). L'acide borique (CAS 10043-35-3) peut également servir de substance chimique de référence, mais il a été toutefois moins étudié. On peut choisir l'un des deux modèles expérimentaux suivants:

— On peut parallèlement tester la substance chimique de référence et déterminer la toxicité de chaque substance chimique d'essai à une concentration préalablement identifiée dans une étude dose-réponse pour provoquer une réduction > 50 % de la descendance. Dans ce cas, le nombre d'expériences identiques sera le même que celui des témoins (voir paragraphe 29).

— On peut aussi tester la substance chimique de référence 1 à 2 fois par an dans un essai dose-réponse. Selon le modèle choisi, les nombres de concentrations et d'expériences identiques et le facteur d'espacement diffèrent (voir paragraphe 29), mais il faut obtenir une réponse égale à 10 à 90 % de l'effet (facteur d'espacement de 1,8). La CE_{50} du diméthoate calculée d'après le nombre de juvéniles doit être comprise entre 3,0 et 7,0 s.e./kg de sol (ps). D'après les résultats obtenus à ce jour avec l'acide borique, la CE50 basée sur le nombre de juvéniles doit être comprise dans l'intervalle de 100 à 500 mg/kg de ps de sol.

DESCRIPTION DE L'ESSAI

Récipients expérimentaux et matériel

8. Il convient d'utiliser des récipients expérimentaux en verre ou en un autre matériau chimiquement inerte de 3 à 5 cm de diamètre (hauteur de sol ≥1,5 cm) munis d'un couvercle étroitement ajusté. Il est préférable d'employer des bouchons à vis et dans ce cas, il faut aérer les récipients deux fois par semaine. Il est également possible d'utiliser des couvercles qui permettent un échange gazeux direct entre le substrat et l'atmosphère (par exemple, une gaze). Le taux d'humidité doit rester suffisamment élevé pendant l'essai, et il est donc essentiel de vérifier le poids de chaque récipient expérimental durant l'essai et de rajouter de l'eau si nécessaire. Ce contrôle présente une importance particulière lorsque l'on ne dispose pas de bouchons à vis. Si les récipients expérimentaux sont opaques, le matériau du couvercle doit permettre le passage de la lumière (par exemple un couvercle transparent perforé), et empêcher néanmoins les acariens de s'échapper. La taille et le type du récipient expérimental dépendent de la méthode d'extraction (voir Appendice 5 pour plus de détails). Lorsque l'on procède à une extraction à la chaleur directement sur le récipient expérimental, il convient alors d'ajouter au fond un treillis aux mailles de dimensions appropriées (qui restera scellé jusqu'à l'extraction), et d'utiliser une épaisseur de sol suffisante pour l'établissement d'un gradient de température et d'humidité.

▼**M6**

9. Cet essai requiert du matériel de laboratoire standard, en particulier les articles suivants:

— récipients, de préférence en verre avec des bouchons à vis;

— armoire à séchage;

— stéréomicroscope;

— pinceaux pour le transfert des acariens;

— pH-mètre et luxmètre;

— balances suffisamment exactes;

— instruments permettant de contrôler la température;

— instruments permettant de contrôler l'humidité de l'air (facultatifs si les récipients expérimentaux sont fermés par des couvercles);

— incubateur ou petite chambre à température contrôlée;

— matériel pour l'extraction (voir Appendice 5) (13);

— panneau lumineux suspendu avec réglage de la lumière;

— bocaux de récolte pour les acariens extraits.

Préparation du sol artificiel

10. Pour cet essai, on utilise un sol artificiel. Il comprend les composants suivants (toutes les valeurs sont proportionnelles à la masse sèche):

— 5 % de tourbe à sphaigne, séchée à l'air et finement broyée (une dimension des particules de 2 ± 1 mm est acceptable);

— 20 % d'argile kaolinique (teneur en kaolinite de préférence supérieure à 30 %);

— environ 74 % de sable industriel séché à l'air (selon la quantité de $CaCO_3$ nécessaire), essentiellement du sable fin contenant plus de 50 % de particules mesurant entre 50 et 200 microns. La quantité exacte de sable dépend de la quantité de $CaCO_3$ (voir ci-dessous), la proportion combinée des deux composants devant atteindre 75 %.

— < 1,0 % de carbonate de calcium ($CaCO_3$, pulvérisé, qualité analytique) afin d'obtenir un pH de 6,0 ± 0,5; la quantité de carbonate de calcium à ajouter dépend principalement de la qualité et de la nature de la tourbe (voir Note 1).

Note 1: La quantité de $CaCO_3$ requise dépendra des composants du substrat de sol et doit être déterminée par mesure du pH sur des échantillons prélevés dans le sol immédiatement avant l'essai (14)

Note 2: La proportion de tourbe dans le sol artificiel diffère de celle recommandée dans les autres méthodes d'essai sur les organismes du sol, dans lesquelles on utilise dans la plupart des cas 10 % de tourbe [par exemple (15)]. Toutefois, selon l'OEPP (16), un sol agricole type ne contient pas plus de 5 % de matières organiques et la réduction de la proportion de tourbe vise à représenter les capacités réduites de sorption par un sol naturel de la substance chimique d'essai sur le carbone organique.

Note 3: Si besoin est, par exemple à des fins d'essai spécifiques, des sols naturels provenant de sites non pollués peuvent également servir de substrat d'essai et/ou de culture. Toutefois, lorsque l'on utilise un sol naturel, il faut le caractériser au moins par son origine (site de récolte), son pH, sa texture (distribution de tailles de particules) et sa teneur en matières organiques. Le cas échéant, le type et le nom du sol seront mentionnés conformément à la

▼M6

classification des sols, et le sol doit être exempt de toute contamination. Dans le cas où la substance chimique d'essai est un métal ou un composé organométallique, il conviendra également de déterminer la capacité d'échange de cations (CEC) du sol naturel. On s'efforcera tout particulièrement de satisfaire les critères de validité, car les informations de référence sur les sols naturels sont habituellement rares.

11. Les constituants secs du sol sont soigneusement mélangés (par exemple, dans un grand mélangeur de laboratoire). Le pH est déterminé avec un mélange de sol et d'une solution de chlorure de potassium (KCl) 1 M ou de chlorure de calcium ($CaCl_2$) 0,01 M dans un rapport 1/5 [voir (14) et Appendice 3]. Si l'acidité du sol est supérieure à la limite requise (voir paragraphe 10), elle peut être ajustée par addition d'une quantité appropriée de $CaCO_3$. Si le sol est trop alcalin, le pH peut être abaissé par l'addition d'un supplément du mélange comprenant les trois premiers composants décrits au paragraphe 10, à l'exclusion du $CaCO_3$.

12. La capacité de rétention d'eau (CRE) maximale du sol artificiel est déterminée conformément aux protocoles décrits dans l'Appendice 2. Deux à sept jours avant le début de l'essai, le sol artificiel sec est préhumidifié par addition d'une quantité suffisante d'eau distillée ou désionisée pour atteindre environ la moitié de la teneur en eau finale, c'est-à-dire 40 à 60 % de la CRE maximale. Le taux d'humidité est ajusté à 40-60 % de la capacité de rétention d'eau maximale par addition de la solution de substance chimique d'essai et/ou addition d'eau distillée ou désionisée (voir paragraphes 16-18). Il est possible d'estimer approximativement le taux d'humidité du sol en pressant doucement une poignée de sol dans la main: si le taux d'humidité est correct, de petites gouttes d'eau apparaissent entre les doigts.

13. La teneur en humidité du sol est déterminée au début et à la fin de l'essai par séchage à 105 °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant, conformément à la norme ISO 11465 (17) et à un pH du sol conforme à l'Appendice 3 ou à la norme ISO 10390 (14). Ces mesures doivent être réalisées dans des échantillons supplémentaires sans acarien, sur le sol témoin et sur des sols contenant chaque concentration d'essai. Il ne faut pas ajuster le pH du sol lorsque l'on teste des substances acides ou basiques. Il convient de vérifier la teneur en humidité pendant tout l'essai par pesée périodique des récipients (voir paragraphes 20 et 24).

Sélection et préparation des animaux expérimentaux

14. L'espèce utilisée dans l'essai est *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883). Des acariens adultes femelles, prélevés dans une cohorte synchronisée, sont nécessaires au début de l'essai. Les acariens sont introduits environ 7 à 14 jours après le passage au stade adulte, 28 à 35 jours après le début de la ponte dans le processus de synchronisation (voir paragraphe 3 et Appendice 4). La source des acariens ou leur fournisseur et le maintien de la culture au laboratoire doivent être enregistrés. Lorsqu'une culture est maintenue au laboratoire, il est recommandé de confirmer l'identité des espèces au moins une fois par an. L'Appendice 6 comprend une fiche d'identification.

Préparation des concentrations expérimentales

15. La substance d'essai est mélangée dans le sol. Il convient de choisir les solvants organiques utilisés pour faciliter le traitement du sol par la substance d'essai sur des critères de faible toxicité pour les acariens, et un témoin de solvant approprié doit être inclus dans l'essai (voir paragraphe 29).

Substance d'essai hydrosoluble

16. Une solution de la substance chimique d'essai dans de l'eau désionisée est préparée en une quantité suffisante pour toutes les expériences identiques d'une concentration expérimentale. Il est recommandé d'utiliser la quantité d'eau nécessaire pour obtenir le taux d'humidité requis, à savoir 40 à 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau (voir paragraphe 12). Chaque solution de la substance d'essai est mélangée complètement avec un lot du sol préhumidifié, avant d'être introduite dans le récipient expérimental.

▼M6

Substance chimique d'essai hydrosoluble

17. Les substances chimiques non solubles dans l'eau mais solubles dans des solvants organiques peuvent être dissoutes dans le plus petit volume possible d'un véhicule approprié (par exemple de l'acétone). Seuls des solvants volatils peuvent être utilisés. Dans le cas où ces véhicules sont utilisés, toutes les concentrations expérimentales et les témoins contiennent la même quantité minimale du véhicule. Le véhicule est pulvérisé sur ou mélangé à une petite quantité, 10 g par exemple, de sable quartzique fin. Il convient de corriger la quantité de sable contenu dans le substrat pour tenir compte de cette quantité. Ensuite, le véhicule est éliminé par évaporation sous une hotte durant au moins une heure. Ce mélange de sable quartzique et de la substance d'essai est ajouté au sol préhumidifié, auquel il est soigneusement mélangé après l'ajout de la quantité nécessaire d'eau désionisée pour atteindre l'humidité requise. Le mélange final est introduit dans les récipients expérimentaux. Il convient de noter que certains solvants peuvent être toxiques pour les acariens. Par conséquent, il est recommandé d'utiliser un témoin d'eau supplémentaire sans véhicule lorsque cette toxicité est inconnue. La démonstration fiable d'absence d'effet du solvant (aux concentrations appliquées) permet d'omettre le témoin d'eau.

Substance chimique d'essai peu soluble dans l'eau et les solvants organiques

18. Pour les substances chimiques peu solubles dans l'eau et les solvants organiques, on mélange l'équivalent de 2,5 g de sable quartzique finement broyé par récipient expérimental (par exemple, 10 g de sable quartzique fin pour quatre expériences identiques) à la quantité nécessaire de la substance d'essai pour obtenir la concentration expérimentale voulue. Il convient de corriger la quantité de sable contenu dans le substrat pour tenir compte de cette quantité. Ce mélange de sable quartzique et de la substance chimique d'essai est ajouté au sol préhumidifié, auquel il est soigneusement mélangé après l'ajout de la quantité nécessaire d'eau désionisée pour atteindre l'humidité requise. Le mélange final est réparti entre les récipients expérimentaux. On répète la procédure pour chaque concentration expérimentale et on prépare un témoin approprié.

MODE OPÉRATOIRE

Groupes traités et témoins

19. Il est recommandé d'utiliser dix adultes femelles dans 20 g de masse sèche de sol artificiel dans chaque récipient témoin et traité. Les organismes expérimentaux doivent être ajoutés dans les deux heures qui suivent la préparation du substrat d'essai final (c'est-à-dire après l'application de la substance d'essai). Dans certains cas particuliers (par exemple, lorsque le vieillissement est considéré comme un facteur déterminant), la durée écoulée entre la préparation du substrat d'essai final et l'addition des acariens peut être prolongée (pour des détails sur ce vieillissement, voir (18)). Il convient toutefois de fournir une justification scientifique de cette décision.

20. Une fois les acariens ajoutés au sol, ils sont nourris, et le poids initial de chaque récipient expérimental doit être mesuré pour servir de référence lors du contrôle du taux d'humidité du sol tout au long de l'essai, comme il est décrit au paragraphe 24. Les récipients expérimentaux sont ensuite couverts comme il est décrit au paragraphe 8 et placés dans la chambre expérimentale.

21. Des témoins appropriés à la méthode d'application de la substance chimique d'essai, présentée dans l'un des paragraphes 15 à 18, sont préparés. La préparation des témoins se conforme aux protocoles décrits, sans addition de la substance chimique d'essai. Ainsi, le cas échéant, des solvants organiques, du sable quartzique ou d'autres véhicules sont utilisés dans les témoins en concentrations/quantités équivalentes à celles des traitements. Lorsqu'un solvant ou un autre véhicule est employé pour ajouter la substance chimique d'essai, il faut également préparer un témoin supplémentaire sans véhicule ni substance d'essai et le tester chaque fois que la toxicité du solvant est inconnue (voir paragraphe 17).

▼M6

Conditions expérimentales

22. La température expérimentale doit être de 20 ± 2 °C. Elle doit être enregistrée au moins quotidiennement et ajustée, s'il y a lieu. L'essai est mené dans des conditions de cycles de lumière et d'obscurité contrôlés (de préférence 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité) avec un éclairement de 400 à 800 lux dans la zone des récipients expérimentaux. À des fins de comparaisons, ces conditions sont identiques à celles appliquées dans d'autres essais écotoxicologiques dans le sol [par exemple, (15)].

23. Les échanges gazeux doivent être assurés par aération des récipients expérimentaux au moins deux fois par semaine lorsque l'on utilise des bouchons à vis. Dans le cas d'une ouverture couverte de gaze, il convient de veiller particulièrement au maintien du taux d'humidité du sol (voir paragraphes 8 et 24).

24. La teneur en eau du substrat de sol dans les récipients expérimentaux est maintenue pendant toute la durée de l'essai en pesant les récipients expérimentaux, et s'il y a lieu, en y rajoutant périodiquement de l'eau (par exemple une fois par semaine). Les pertes doivent être compensées selon les besoins par de l'eau désionisée. Le taux d'humidité pendant l'essai ne doit pas s'écarter de plus de 10 % de la valeur initiale.

Alimentation

25. On a montré que les acariens du fromage [*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)] constituaient une source d'aliment appropriée. De petits collemboles (par exemple *Folsomia candida* juvénile Willem, 1902 ou *Onychiurus fimatus* (19, 20), des enchytrées (par exemple *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992) ou des nématodes (par exemple *Turbatrix silusiae* de Man, 1913) peuvent également convenir (21). Il est recommandé de contrôler les aliments avant de les utiliser dans un essai. Le type et la quantité d'aliments doivent assurer l'obtention d'un nombre de juvéniles suffisant pour remplir les critères de validité (paragraphe 6). Lors du choix des proies, il convient de considérer le mode d'action de la substance d'essai (par exemple, un acaricide peut se révéler toxique aussi pour les acariens qui servent d'aliments, voir paragraphe 26).

26. Les aliments doivent être fournis *ad libitum* [mais en petite quantité à chaque fois (pointe de spatule)]. A cette fin, on peut également utiliser un aspirateur à succion douce comme il est proposé dans l'essai sur les collemboles, ou un pinceau fin. Il suffira généralement de distribuer les aliments au début de l'essai et deux à trois fois par semaine. Si la substance d'essai se révèle toxique pour la proie, il faudra envisager d'augmenter la fréquence d'alimentation et/ou d'employer une autre source d'aliments.

Sélection des concentrations expérimentales

27. Des informations préalables sur la toxicité de la substance chimique d'essai, issues par exemple d'études préliminaires de sélection des concentrations, devraient faciliter la sélection des concentrations expérimentales appropriées. Si besoin est, une étude préliminaire est menée, avec cinq concentrations de la substance chimique d'essai dans la gamme de 0,1 - 1 000 mg/kg de sol sec, avec au moins une expérience par traitement et un témoin. L'étude préliminaire dure 14 jours, à l'issue desquels la mortalité des acariens adultes et le nombre de juvéniles sont déterminés. Il est préférable de choisir dans l'essai final une gamme de concentrations qui inclut des concentrations affectant les nombres de juvéniles mais non la survie de la génération maternelle. Cette démarche est toutefois exclue pour les substances chimiques qui provoquent des effets létaux et sub-létaux à des concentrations pratiquement similaires. La concentration efficace (par exemple CE_{50}, CE_{25}, CE_{10}) et la gamme de concentrations pour laquelle l'effet de la substance d'essai présente un intérêt doivent être contenues dans l'intervalle des concentrations de l'essai. L'extrapolation à des valeurs très inférieures à la concentration la plus basse qui affecte les organismes expérimentaux ou supérieures à la concentration la plus élevée de l'essai doit rester exceptionnelle, et justifiée en détail dans le rapport.

Modèle expérimental

Essais dose-réponse

28. Trois modèles d'essai, fondés sur les recommandations issues d'un autre essai tournant (essai de reproduction chez l'enchytrée (22)) sont proposés.

▼M6

L'adéquation générale de ces trois modèles a été confirmée par les résultats de la validation sur *H. aculeifer*.

29. Lors de l'établissement de la gamme de concentrations, il convient de tenir compte des points suivants:

— Pour déterminer la CE_x (par exemple CE_{10}, CE_{50}), il faut tester douze concentrations. Il est recommandé d'inclure au moins deux expériences identiques à chaque concentration d'essai et six témoins. Le facteur d'espacement peut varier, mais doit être inférieur ou égal à 1,8 dans la gamme efficace anticipée et supérieur à 1,8 aux concentrations plus élevées et plus faibles.

— Pour déterminer la CSEO, il faut tester au moins cinq concentrations formant une série géométrique. Il est recommandé d'inclure quatre expériences identiques par concentration expérimentale et huit témoins. Les concentrations doivent être espacées d'un facteur d'au plus 2,0.

— Une approche combinée permet de déterminer à la fois la CSEO et la CE_x. Il faut alors utiliser huit concentrations expérimentales formant une série géométrique. Il est recommandé d'inclure quatre expériences identiques par traitement et huit témoins. Les concentrations doivent être espacées d'un facteur d'au plus 1,8.

Essai limite

30. Si la concentration la plus élevée (par exemple 1 000 mg/kg) dans l'essai préliminaire de sélection des concentrations n'engendre aucun effet, l'essai de reproduction final peut être mené sous forme d'un essai limite, à la concentration expérimentale de 1 000 mg/kg ps de sol. Un essai limite permet de démontrer que la CSEO ou la CE_{10} pour la reproduction est supérieure à la concentration limite, en employant un nombre minimal d'acariens dans l'essai. Il faut alors utiliser huit expériences identiques pour le sol traité et pour le témoin.

Durée de l'essai et mesures

31. Toutes les différences observées de comportement et de morphologie des acariens entre les récipients témoins et les récipients traités doivent être notées.

32. Le 14^e jour, les acariens survivants sont séparés du sol par extraction à la chaleur ou à la lumière ou par une autre méthode appropriée (voir Appendice 5). Les juvéniles (c'est-à-dire larves, protonymphes et deutonymphes) et les adultes sont comptés séparément. Tous les acariens adultes qui ne sont pas récupérés à ce stade doivent être comptabilisés comme morts, car on suppose qu'ils sont décédés et se sont décomposés avant l'évaluation. Il faut valider l'efficacité d'extraction une ou deux fois par an sur des témoins contenant des nombres connus d'adultes et de juvéniles. L'efficacité doit être supérieure à 90 % en moyenne combinée pour tous les stades de développement (voir Appendice 5). Les nombres des adultes et des juvéniles ne seront pas ajustés en fonction de l'efficacité.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

33. Les paragraphes 36 à 41 contiennent des informations sur les méthodes statistiques susceptibles d'être utilisées pour analyser les résultats de l'essai. Il faut également consulter le Document 54 de l'OCDE intitulé «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application».

34. Le résultat principal de l'essai est le taux de reproduction, c'est-à-dire le nombre de juvéniles produits par récipient expérimental (dans lequel 10 femelles adultes ont été introduites). L'analyse statistique requiert le calcul

▼M6

de la moyenne arithmétique (X) et de la variance (s^2) du taux de reproduction par traitement et par témoin. X et s^2 sont employés dans des analyses de variance telles que le test t de Student, le test de Dunnett ou le test de William, et pour calculer des intervalles de confiance à 95 %.

Note: Ce résultat principal équivaut à la mesure de fécondité représentée par le nombre de juvéniles vivants produits pendant l'essai divisé par le nombre de parents femelles introduits au début de l'essai.

35. Le nombre de femelles survivantes dans les témoins non traités est un critère de validité essentiel qui doit être détaillé. Comme dans l'essai préliminaire de sélection des concentrations, tous les autres signes de nocivité doivent également être consignés dans le rapport final.

CEx

36. On calcule les valeurs de CE_x et leurs limites de confiance à 95 % supérieures et inférieures correspondant au paramètre décrit dans le paragraphe 34 en utilisant des méthodes statistiques adéquates (par exemple, analyse probit, fonction logistique ou de Weibull, méthode simplifiée de Spearman-Karber, ou simple interpolation). Une CE_x est obtenue en intégrant une valeur correspondant à x % de la moyenne du témoin dans l'équation retenue. Pour calculer la CE_{50} ou tout autre CE_x, il faut soumettre les moyennes par traitement (X) à une analyse de régression.

CSEO/CMEO

37. Lorsqu'une analyse statistique est appliquée pour déterminer la CSEO/CMEO, il faut disposer de statistiques par récipient (chaque récipient individuel est considéré comme une expérience). Il convient alors d'utiliser des méthodes statistiques adéquates (conformément au Document 54 de l'OCDE intitulé «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application»). En général, les effets indésirables de la substance d'essai par rapport au témoin sont examinés en utilisant une hypothèse unilatérale (inférieure) avec une analyse à $p \leq 0,05$. Les paragraphes suivants en comprennent des exemples.

38. La distribution normale des données peut être analysée, par exemple, par le test d'ajustement de Kolmogorov-Smirnov, le test du rapport rang à écart-type (test R/s) ou le test de Shapiro-Wilk (bilatéral, $p \leq 0,05$). On peut utiliser le test de Cochran, le test de Levene ou le test de Bartlett (bilatéral, $p \leq 0,05$) pour tester l'homogénéité de la variance. Lorsque les pré-requis des procédures de tests paramétriques sont satisfaits (normalité, homogénéité de la variance), on peut appliquer une analyse de variance une voie, puis des tests multicomparatifs. Les tests de comparaison multiples (par exemple, tests t de Dunnett) ou les tests de tendance décroissante (par exemple, test de Williams dans le cas d'une relation réponse à la dose monotone) peuvent être utilisés pour calculer, le cas échéant, des différences significatives ($p \leq 0,05$) entre les témoins et les diverses concentrations de la substance d'essai (on choisira le test recommandé conformément au Document 54 de l'OCDE intitulé «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application»). On peut toutefois utiliser des méthodes non paramétriques (test U de Bonferroni conformément à Holm ou test de tendance de Jonckheere-Terpstra) pour déterminer la CSEO et la CMEO.

Essai limite

39. Si un essai limite a été mis en œuvre (comparaison du témoin et d'un seul traitement) et que les conditions requises pour les procédures de tests paramétriques (normalité, homogénéité) sont remplies, on peut évaluer les réponses métriques par le test de Student (test t). Le test t de variance inégale (test t de Welch) ou bien un test t non paramétrique tel que le test U de Mann-Whitney peuvent être employés lorsque ces conditions ne sont pas satisfaites.

40. Si l'on cherche à déterminer des différences significatives entre les témoins (témoin et témoin de solvant), les réplicas de chaque témoin peuvent être testés comme il est décrit pour l'essai limite. Lorsque les essais ne détectent

▼M6

aucune différence significative, il est possible de rassembler toutes les expériences identiques témoins et témoins de solvant. Dans le cas contraire, il faut comparer tous les traitements avec le témoin de solvant.

Rapport d'essai

41. Le rapport d'essai doit comprendre au moins les informations suivantes:

— *Substance chimique d'essai*

— identité de la substance chimique d'essai, lot de fabrication, lot de conditionnement et numéros CAS, pureté;

— propriétés physico-chimiques de la substance chimique d'essai (par exemple log K_{oe}, hydrosolubilité, pression de vapeur, constante de Henry (H) et de préférence, information sur le devenir de la substance chimique d'essai dans le sol).

— *Organismes expérimentaux*

— identification et fournisseur des organismes expérimentaux, description des conditions d'élevage;

— gamme d'âges des organismes expérimentaux.

— *Conditions expérimentales*

— description du modèle expérimental et du mode opératoire;

— détails sur la préparation du sol d'essai; description détaillée lorsque l'on utilise un sol naturel (origine, histoire, distribution de tailles de particules, pH, teneur en matières organiques, et, le cas échéant, classification du sol);

— capacité maximale de rétention d'eau du sol;

— description de la méthode d'application de la substance chimique d'essai dans le sol;

— conception expérimentale et mode opératoire;

— dimension des récipients expérimentaux et masse sèche de sol d'essai par récipient;

— Conditions expérimentales intensité lumineuse, durée des cycles de lumière et d'obscurité, température;

— description du régime d'administration de la nourriture, nature et quantité de nourriture fournie au cours de l'essai, dates d'alimentation;

— pH et teneur en eau du sol au début et pendant l'essai;

— description détaillée de la méthode d'extraction et de l'efficacité d'extraction.

— *Résultats de l'essai*

— nombre de juvéniles déterminé dans chaque récipient expérimental à la fin de l'essai;

— nombre de femelles adultes et mortalité des adultes (%) dans chaque récipient expérimental à la fin de l'essai;

— description des symptômes évidents ou des changements nets de comportement;

— résultats obtenus avec la substance chimique de référence de l'essai;

— résumé des analyses statistiques (CE_x et/ou CSEO) y compris les limites de confiance à 95 % et la description de la méthode de calcul;

▼**M6**

— courbe de la relation concentration-réponse;

— écarts par rapport aux protocoles décrits dans la présente méthode d'essai et faits inhabituels, quels qu'ils soient, survenus au cours de l'essai

BIBLIOGRAPHIE

(1) Casanueva, M.E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). Gayana Zool. 57, 21-46.

(2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidinae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. Pacific Insects 24, 259-274.

(3) Bakker, F.M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. and van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. JSS — Journal of Soils and Sediments 3, 73-77.

(4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2nd edition In: Dahl, F. (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 pp.

(5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the population development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). In: F. Dusbabek & V. Bukva (eds.): Modern Acarology. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487-492

(6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Proc. 2nd Symp. EURAAC: p 241-249.

(7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. Proc. IXth Internat. Congr. Acarol. 1994, Columbus, Ohio: p 621-628.

(8) Krogh, P.H. and Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. In: Lokke, H. and van Gestel, C.A.M.: Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley Sons, Chichester, p 239-251.

(9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Römbke, J., Rundgren, S. and Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests — Invertebrates. In: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. (eds.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 pp.

(10) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. Zool. Beiträge, 34, 395-433.

(11) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Boden-raubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. N.F. 34, 413-433.

(12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K. and Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite Hypoaspis aculeifer Canestrini (Gamasida: Laelapidae). Environmental Science & Technology 39, 7154-7157.

(13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. Natura Jutlandica 20, 95-122.

(14) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1994). Qualité du sol – Détermination du pH, No. 10390. ISO, Genève.

▼**M6**

(15) Chapitre C.8 de la présente annexe — Toxicité pour les vers de terre.

(16) EPPO (2003): EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195-209.

(17) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1993). Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau – Méthode gravimétrique, No. 11465. ISO, Genève.

(18) Fairbrother, A., Glazebrock, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. 2002. Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.

(19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von Hypoaspis aculeifer Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit Onychiurus fimatus Gisin (Collembola). Ges.allg..angew. Ent. 3:122-125.

(20) Schlosser, H.J., und Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilden (Gamasina). Zool.Beitr. N.F. 34(3):395-433.

(21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. and Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator Hypoaspis aculeifer (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130-135.

(22) Chapitre C.32 de la présente annexe — Essai de reproduction chez l'enchytrée.

(23) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1994). Qualité du sol – Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (Eisenia fetida). Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction, No. 11268-2. ISO, Genève.

(24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 pp.

(25) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 pp.

(26) Lesna, I. and Sabelis, M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with «good genes» in a soil predatory mite. Nature 401, 581-583.

(27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103-107.

(28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.

(29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). Zoologica Poloniae 24, 11-59.

(30) Kevan, D.K. McE. and Sharma, G.D. (1964). Observations on the biology of Hypoaspis aculeifer (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). Acarologia 6, 647-658.

(31) OCDE (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE — Série sur les essais et évaluations n°54. ENV/JM/MONO(2006)18

▼**M6**

Appendice 1

Définitions

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente méthode d'essai (dans cet essai, toutes les concentrations efficaces sont exprimées en masse de la substance chimique d'essai rapportée à la masse sèche du sol d'essai):

Substance chimique: une substance ou un mélange

CSEO (concentration sans effet observé): désigne la concentration de la substance chimique d'essai à laquelle aucun effet n'est observé. Dans cet essai, la concentration correspondant à la CSEO n'a pas d'effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) durant une période d'exposition donnée, en comparaison avec le témoin.

CMEO (concentration minimale avec effet observé): la plus faible concentration de la substance chimique d'essai qui exerce un effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) durant une période d'exposition donnée, en comparaison avec le témoin.

CE_x (concentration efficace à x %): concentration qui engendre un effet de x % sur les organismes d'expérience durant une période d'exposition déterminée, en comparaison avec un témoin. Par exemple, une CE_{50} est une concentration estimée produire un effet sur un paramètre évalué de l'essai dans 50 % d'une population exposée durant une période d'exposition déterminée.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼**M6**

Appendice 2

Détermination de la capacité maximale de rétention d'eau du sol

La méthode suivante de détermination de la capacité maximale de rétention d'eau du sol a fait ses preuves. Elle est décrite à l'annexe C de la norme ISO DIS 11268-2 (Qualité du sol – Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*). Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction (23).

Prélever une quantité déterminée (5 g, par exemple) du sol expérimental servant de substrat à l'aide d'un instrument approprié (tube de tarière, etc.). Couvrir le fond du tube d'un morceau de papier filtre imbibé d'eau, puis placer le tube sur un support dans un bain d'eau. Le tube doit être progressivement immergé jusqu'à ce que le niveau d'eau passe au-dessus du sol. Laisser le tube dans l'eau durant environ trois heures. Comme l'eau absorbée par les capillaires du sol ne peut pas être retenue en totalité, il faut la laisser s'évacuer de l'échantillon de sol durant deux heures en plaçant le tube sur un lit de sable quartzique finement broyé très humide contenu dans un récipient fermé (pour qu'il ne sèche pas). Il faut ensuite peser l'échantillon et le sécher à 105 °C jusqu'à ce qu'il atteigne une masse constante. La capacité de rétention d'eau (CRE) est ensuite calculée comme suit:

$$\text{CRE}(\text{en\% de masse sèche}) = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

où:

S = masse du substrat saturé en eau + masse du tube + masse du papier filtre

T = tare (masse du tube + masse du papier filtre)

D = masse sèche du substrat

▼**M6**

Appendice 3

Détermination du pH du sol

La méthode de détermination du pH d'un sol, décrite ci-dessous s'appuie sur la norme ISO 10390: Qualité du sol — Détermination du pH (16).

On laisse sécher une quantité définie de sol à température ambiante durant au moins 12 heures. On prépare une suspension du sol (contenant au moins 5 g de sol) dans cinq fois son volume d'une solution de chlorure de potassium (KCl) 1 M de qualité analytique ou d'une solution de chlorure de calcium ($CaCl_2$) 0,01 M de qualité analytique. On agite vigoureusement la suspension durant cinq minutes et on la laisse sédimenter durant au moins deux heures, mais pas plus de 24 heures. On mesure ensuite le pH de la phase liquide à l'aide d'un pH-mètre, étalonné avant chaque mesure à l'aide d'une série appropriée de solutions tampons (pH 4,0 et 7,0, par exemple).

▼M6

Appendice 4

Élevage de *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*, d'acariens des aliments et synchronisation des cultures

Élevage de Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer:

Les cultures peuvent être maintenues dans des récipients de plastique ou des flacons de verre remplis d'un mélange de plâtre de Paris et de poudre de charbon (9/1). Le plâtre doit rester humide grâce à l'addition, si besoin est, de quelques gouttes d'eau distillée ou désionisée. Les températures d'élevage optimales sont comprises dans l'intervalle de 20 ± 20 °C, le régime de lumière et d'obscurité n'est pas déterminant pour cette espèce. Les proies peuvent être des acariens Typrophagus putrescentiae ou Caloglyphus (les acariens des aliments doivent être manipulés avec précaution car ils peuvent provoquer des allergies chez l'homme), mais les nématodes, les enchytrées et les collemboles sont également des proies adéquates. Leur provenance doit être consignée. Il est possible d'initier le développement de la population à partir d'une seule femelle, car les mâles se développent dans les œufs non fécondés. Les générations se chevauchent dans une large mesure. Une femelle peut vivre au moins 100 jours et pondre environ 100 œufs au cours de sa vie. Le taux de ponte maximal est atteint entre 10 et 40 jours (à l'âge adulte) et il s'élève à 2,2 œufs femelle^{-1} jour^{-1}. Le développement de l'œuf jusqu'au stade adulte de la femelle dure environ 20 jours à 20 °C. Il faut maintenir et traiter plusieurs cultures à l'avance.

Élevage de Typrophagus putrescentiae:

Les acariens sont élevés dans un récipient en verre rempli de poudre de levure de bière fine, et placé dans un seau en plastique rempli d'une solution de KNO_3 qui empêche la fuite des animaux. Les acariens des aliments sont placés au dessus de cette poudre. Ensuite, ils sont soigneusement mélangés à la poudre (à remplacer deux fois par semaine) à l'aide d'une spatule.

Synchronisation de la culture:

Les spécimens utilisés dans l'essai doivent avoir à peu près le même âge (environ 7 jours après le passage au stade adulte). À la température d'élevage de 20 OQ la synchronisation est réalisée de la manière suivante:

Les femelles sont transférées dans un récipient d'élevage propre et reçoivent une quantité suffisante de nourriture

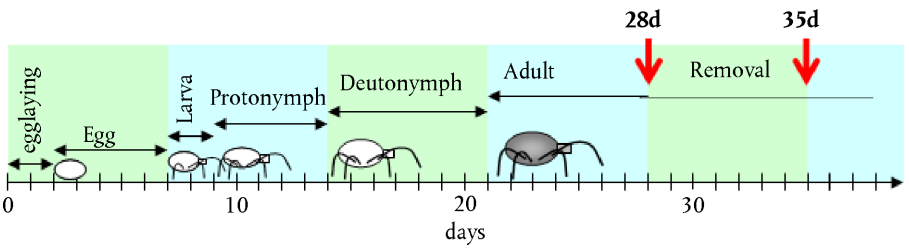
— On les laisse pondre pendant deux ou trois jours, puis elles sont récoltées

— Les femelles adultes sont prélevées pour l'essai entre le 28ème et le 35ème jour après le placement des femelles adultes dans des récipients d'élevage propres.

Il est facile de distinguer les femelles adultes des mâles et des animaux aux autres stades de développement par leur dimension plus grande, leur forme boursouflée et leur bouclier dorsal brun car les mâles sont plus minces et plats, et les stades immatures sont blancs à crèmes. Le développement des acariens est à peu près conforme au modèle décrit ci-dessous à 20 °C (Figure): oeuf 5 j, larve 2 j, protonymphe 5 j, deutonymphe 7 j, période de préoviposition de la femelle 2 j. Ensuite, les acariens sont adultes.

Figure

Développement de Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer à 20 °C. (prélèvement = femelles utilisées pour l'essai)



▼**M6**

Les animaux adultes sont prélevés dans la culture synchronisée et introduits dans les récipients expérimentaux entre le 28e et le 35e jour après le début de la ponte des parents femelles (c'est-à-dire 7-14 jours après le passage à l'âge adulte). On s'assure ainsi que les animaux de l'essai sont au-delà de la période de préoviposition et se sont accouplés avec des mâles qui sont également présents dans le récipient de culture. Des observations réalisées sur des cultures de laboratoire suggèrent que, lorsque des mâles sont présents, les femelles s'accouplent dès le passage à l'âge adulte ou peu après (Ruf, Vaninnen, obs. pers.). La période de sept jours est retenue car elle s'intègre facilement à la routine du laboratoire et atténue la variabilité développementale individuelle entre les acariens. L'oviposition doit être initiée avec un nombre de femelles au moins égal à celui qui sera finalement nécessaire pour l'essai (par exemple, s'il faut 400 femelles dans l'essai, il faudra laisser pondre au moins 400 femelles pendant deux à trois jours. Le nombre d'œufs au point de départ de la population synchronisée doit être d'au moins 1 200 [proportion relative des sexes environ 0,5, mortalité environ 0,2)]. Afin d'éviter le cannibalisme, il est préférable que chaque récipient renferme au plus 20 à 30 femelles en période de ponte.

▼**M6**

Appendice 5

Méthodes d'extraction

L'extraction à la chaleur est une méthode qui convient à la séparation de microarthropodes à partir d'un sol ou d'un substrat (voir figure ci-dessous). La méthode tire parti de l'activité des organismes, et ainsi, seuls les spécimens mobiles sont susceptibles d'être enregistrés. Le principe de l'extraction à la chaleur consiste à dégrader progressivement les conditions dans l'échantillon pour inciter les organismes à quitter le substrat et les faire tomber dans un liquide de fixation (par exemple éthanol). Les paramètres déterminants sont la durée de l'extraction et l'évolution des conditions appliquées, qui varient de bonnes à modérément bonnes puis deviennent mauvaises pour les organismes. Dans des essais écotoxicologiques, la durée de l'extraction doit être aussi brève que possible, car toute croissance de la population au cours de l'extraction falsifie les résultats. Par ailleurs, les conditions de températures et d'humidité dans l'échantillon doivent toujours garder des valeurs compatibles avec le déplacement des acariens. Le chauffage d'un échantillon de sol provoque la dessiccation du substrat. Si celle-ci est trop rapide, certains acariens se dessècheront en même temps et ne parviendront pas à s'enfuir.

Par conséquent, le protocole suivant est proposé (24) (25):

Appareil: Entonnoir de Tullgren ou équipement comparable, pour appliquer, par exemple la méthode de McFadyen (chauffage par-dessus, l'échantillon est placé sur un entonnoir)

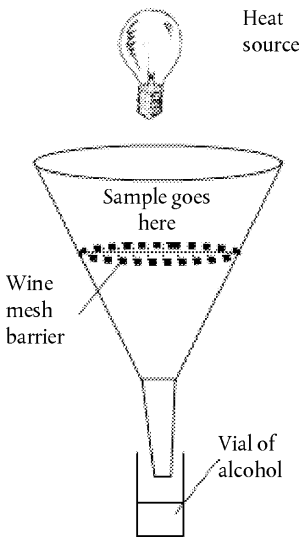
Régime de chauffage: 25 °C pendant 12 h, 35 °C pendant 12 h, 45 °C pendant 24 heures (48 h au total). La température doit être mesurée dans le substrat.

Liquide de fixation: éthanol 70 %

Description détaillée: Utiliser le flacon de verre qui a servi pour l'essai. Retirer le couvercle et couvrir l'ouverture d'un morceau de treillis ou d'étoffe. L'étoffe doit avoir une dimension de maille de 1,0 à 1,5 mm. Fixer l'étoffe avec un élastique. Renverser soigneusement le flacon et le placer dans l'appareil d'extraction. L'étoffe empêche le substrat de couler dans le liquide de fixation, mais laisse les acariens sortir de l'échantillon. Démarrer le chauffage en appliquant le régime ci-dessus après avoir inséré tous les flacons. Terminer l'extraction au bout de 48 heures. Retirer les flacons de fixation et compter les acariens à l'aide d'un microscope à dissection.

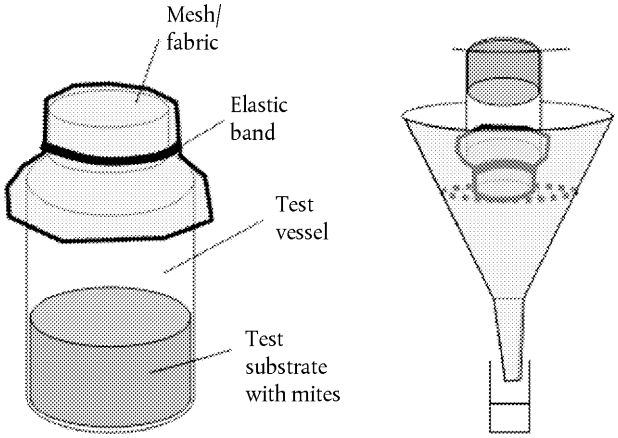
Il faut démontrer l'efficacité d'extraction de la méthode choisie une ou deux fois par an en utilisant des récipients contenant un nombre connu d'acariens juvéniles et adultes élevés dans un substrat d'essai non traité. L'efficacité doit atteindre ≥ 90 % en moyenne combinée pour tous les stades de développement.

Dispositif d'extraction de type Tullgren



▼**M6**

Comment préparer le flacon expérimental à la fin de l'essai et avant l'extraction



▼**M6**

Appendice 6

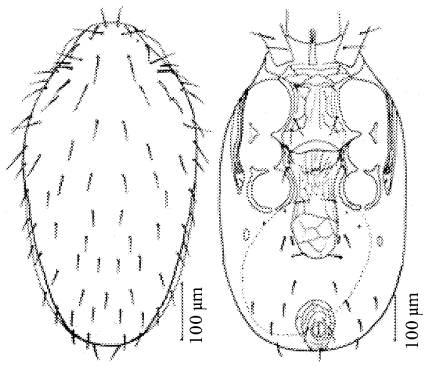
Identification de Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer

Sous-classe/ordre/sous-ordre:	Famille:	Genre/sous-genre/espèce:
Acari/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae	*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

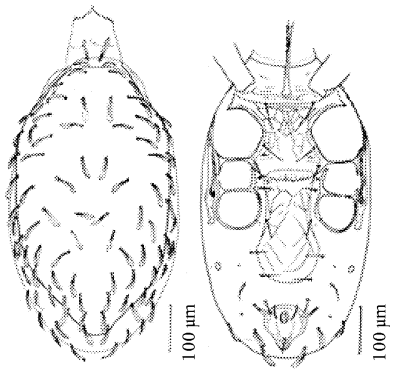
Auteur et Date:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23 janvier 2007

Article utilisé:	Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2e édition révisée: 1-523. Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400pp. Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 pp.

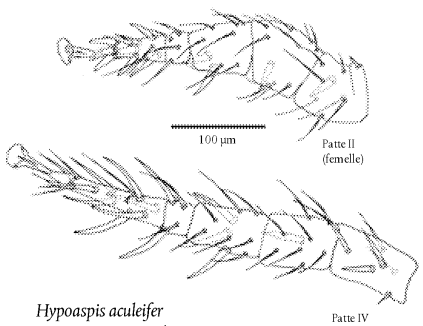
Caractéristique s de détermination:	Tectum avec un bord denticulaire arrondi; sillons hypostomaux comprenant plus de 6 denticules; poils dorsaux caudaux Z4 assez courts; poils dorsaux sétiformes; bouclier génital normal peu développé et n'atteignant pas le bouclier anal; moitié postérieure du bouclier dorsal sans poils non appariés; pattes II et IV avec quelques macropoils épais; poil dorsal Z5 environ deux fois plus long que J5; doigt fixe de chélicère avec 12-14 dents et doigt mobile avec 2 dents; Idiosome 520-680 µm de longueur. Hypoaspis miles est également utilisé comme témoin biologique et peut être confondu avec H. aculeifer. La principale différence est la suivante: H. miles appartient au sous-genre Cosmolaelaps et ses poils dorsaux sont en forme de lame tandis que H. aculeifer appartient au sous-genre Geolaelaps avec des poils dorsaux sétiformes.



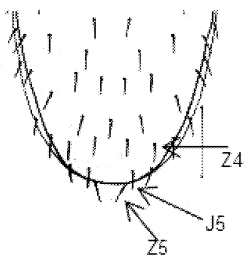
Hypoaspis aculeifer d'après Hughes, 1976



Hypoaspis miles d'après Hughes, 1976



Hypoaspis aculeifer
Dessins originaux de F. Faraji



Hypoaspis aculeifer,
bouclier dorsal avec poils caractéristiques

▼M6

Appendice 7

Informations générales sur la biologie de *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Hypoaspis aculeifer appartient à la famille des Lealapidae, ordre des Acari (acariens), classe des Arachnida, tribu des Arthropoda. Ils vivent dans des sols de tous types et se nourrissent d'autres acariens, de nématodes, d'enchytrées et de collemboles (26). En cas de pénurie alimentaire, ils deviennent cannibales (27). Les acariens prédateurs sont segmentés en idiosome et gnathosome. La différenciation entre l'idiosome dans le prosome (tête) et l'opisthosome (abdomen) n'est pas nette. Le gnathosome (bouclier de la tête contient les pièces pour l'alimentation telles que les pattes et les chélicères. Les chélicères sont divisés en trois branches et munis de dents de différentes formes. Les mâles utilisent leurs chélicères pour l'ingestion, mais également pour transférer les spermatophores aux femelles. Un bouclier dorsal couvre presque complètement l'idiosome. Une grande partie de l'idiosome de la femelle est occupée par les organes reproducteurs, distincts en particulier peu avant la ponte des œufs. Sur la face ventrale, se trouvent deux boucliers, le bouclier sternal et le bouclier génital. Toutes les pattes sont pourvues de soie et d'épines. Les soies servent à l'ancrage lors du déplacement dans le sol ou sur le sol. La première paire de pattes fait essentiellement fonction d'antennes. La seconde paire de pattes sert non seulement au déplacement, mais également à l'immobilisation de la proie. Les épines de la quatrième paire de pattes servent de protection ainsi que de «moteurs de déplacement» (28). Les mâles mesurent de 0,55 à 0,65 mm de long et pèsent de 10 à 15 µg. Les femelles mesurent de 0,8 à 0,9 mm de long et pèsent de 50 à 60 µg (8) (28) (Fig 1).

Fig 1

Femelle, mâle, protonymphe et larve de H. aculeifer.



À 23 °C, les acariens atteignent la maturité sexuelle au bout de 16 jours (femelles) et de 18 jours (mâles), respectivement (6). Les spermatozoïdes sont transportés dans les femelles par le solénostome depuis lequel ils sont transférés dans l'ovaire. Dans l'ovaire, les spermatozoïdes subissent une maturation et sont stockés. La fécondation n'a lieu qu'après la maturation des spermatozoïdes dans l'ovaire. Les ovules fécondés ou non fécondés sont déposés par les femelles en amas ou séparément, de préférence dans des fissures ou des trous. Les femelles qui ont copulé peuvent porter des juvéniles des deux sexes, tandis qu'en l'absence de copulation, les œufs ne produisent que des juvéniles mâles. Au cours du développement jusqu'à l'âge adulte, les acariens traversent quatre phases (œuf-larve, larve-protonymphe, protonymphe-deutonymphe, deutonymphe-adulte).

L'œuf est blanc laiteux, hyalin, elliptique et mesure environ 0,37 mm de long. Il est doté d'un manteau solide. Selon (8), la taille des larves est comprise entre 0,42 et 0,45 mm. Elles n'ont que trois paires de pattes. Des palpes et des chélicères se développent dans la région de la tête. Les chélicères, munis de quelques petits denticules, sont utilisés pour l'éclosion. Après la première mue, un à deux jours après l'éclosion, les protonymphes se développent. Elles sont également blanches, d'une dimension de 0,45 à 0,62 mm (8) et elles possèdent

▼**M6**

quatre paires de pattes. Les chélicères sont entièrement pourvus de dents. C'est à partir de ce stade que les acariens commencent à rechercher leur nourriture. Dans ce but, la cuticule de la proie est percée par les chélicères et une sécrétion qui permet la digestion extra-intestinale est émise dans la proie. La pâte alimentaire peut ensuite être aspirée par l'acarien. Les chélicères peuvent être également utilisés pour fendre des boulettes d'aliments et en extraire des particules plus grosses (28). Les deutonymphes se développent après une nouvelle mue. Elles mesurent de 0,60 à 0,80 mm (8) et sont de couleur jaune à brun clair. À partir de ce stade, on peut séparer les femelles des mâles. Les acariens atteignent l'âge adulte après une nouvelle ecdysis, pendant laquelle les animaux restent inactifs et le bouclier brun se développe (après environ 14 jours) (28) (29) (30). Leur durée de vie se situe entre 48 et 100 jours à 25 °C (27).

▼**M6**

Appendice 8

Résumé et calendrier des principales étapes de l'essai sur Hypoaspis

Temps (jours) début de l'essai = jour 0	Activité/tâche
Jour – 35 à – 28:	Transfert des femelles de la culture mère dans des récipients propres pour initier la synchronisation 2 jours plus tard: prélèvement des femelles Deux ou trois fois par semaine: apport d'aliments en quantité suffisante
Jour – 5 (+/ 2)	Préparation du sol artificiel
Jour – 4 (+/– 2)	Détermination de la capacité de rétention d'eau du sol artificiel Séchage une nuit Jour suivant: pesée des échantillons et calcul de la capacité de rétention d'eau
Jour – 4 (+/– 2)	Pré-humidification du sol artificiel pour obtenir une capacité de rétention d'eau de 20 à 30 %
Jour 0	Début de l'essai: addition de la substance chimique d'essai au sol artificiel Introduction de 10 femelles dans chaque réplica Pesée de chaque réplica Préparation de témoins abiotiques pour la mesure du taux d'humidité et du pH, 2 expériences identiques par traitement Séchage des témoins d'humidité une nuit Jour suivant: pesée des témoins d'humidité Jour suivant: mesure du pH des témoins abiotiques séchés
Jour 3, 6, 9, 12 (environ)	Apport d'une quantité suffisante de proies dans chaque expérience Pesée de chaque expérience et rajout éventuel de la quantité d'eau évaporée
Jour 14	Fin de l'essai, extraction à partir de tous les réplicas et témoins d'efficacité de l'extraction Séchage des témoins de teneur en eau une nuit Jour suivant: pesée des témoins de teneur en eau Jour suivant: mesure du pH des témoins séchés
Jour 16	Fin de l'extraction
Jour 16+	Comptage du nombre d'adultes et de juvéniles dans le matériau extrait Report des résultats sur des tableaux matrices Report du protocole d'essai dans le formulaire des protocoles d'essai.

▼M6

C.37. ESSAI DE 21 JOURS SUR LES POISSONS: ESSAI DE DÉPISTAGE À COURT TERME DE L'ACTIVITÉ ŒSTROGÉNIQUE ET ANDROGÉNIQUE, ET DE L'INHIBITION DE L'AROMATASE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 230 (2009) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Le développement et la validation d'un essai sur les poissons, capable de détecter des substances chimiques agissant sur le système endocrinien, sont devenus nécessaires du fait des inquiétudes suscitées par la présence dans l'environnement de produits chimiques à des concentrations susceptibles d'avoir des effets néfastes sur l'homme et la faune sauvage. En 1998, l'OCDE a lancé une activité à caractère hautement prioritaire visant à réviser les lignes directrices existantes et à élaborer de nouvelles lignes directrices concernant le dépistage et l'essai d'éventuels perturbateurs endocriniens. L'un des volets de cette activité consistait à élaborer une ligne directrice pour le dépistage des substances actives sur le système endocrinien des poissons. L'essai de 21 jours pour le dépistage des perturbateurs endocriniens des poissons a fait l'objet d'un programme de validation très complet comprenant des études inter-laboratoires portant sur une série de substances et visant à démontrer la pertinence et la fiabilité de l'essai pour la détection des agonistes/antagonistes des œstrogènes, des androgènes et de l'enzyme aromatase (1, 2, 3, 4, 5) chez trois espèces de poissons (le tête-de-boule (Pimephales promelas), le medaka japonais (Oryzias latipes) et le poisson-zèbre (Danio rerio)); la détection de l'activité androgénique est possible chez le tête-de-boule et le medaka, mais pas chez le poisson zèbre. La présente méthode d'essai ne permet pas la détection des antagonistes des androgènes. Les travaux de validation ont été revus par un comité composé d'experts désignés par les coordinateurs nationaux du programme sur les lignes directrices pour les essais (6). Cet essai n'est pas conçu pour identifier les mécanismes spécifiques du dérèglement hormonal dans la mesure où les animaux d'essai possèdent un axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG) sain et sont en mesure de réagir aux substances ayant des effets sur l'axe HHG à différents niveaux. L'essai à court terme de reproduction des poissons (ligne directrice 229 de l'OCDE) prend en compte la mesure de la fécondité, et le cas échéant l'histopathologie gonadique pour le tête-de-boule, ainsi que les observations mesurées dans la présente méthode d'essai. La ligne directrice 229 de l'OCDE permet un dépistage des substances chimiques qui affectent la reproduction par différents mécanismes, y compris des mécanismes endocriniens. Ces aspects doivent être pris en considération pour choisir ma méthode d'essai qui répond le mieux aux besoins.

2. La présente méthode d'essai décrit un essai de dépistage *in vivo* sur des groupes de poissons (composés de mâles sexuellement matures et de femelles reproductrices) exposés à une substance pendant une durée limitée de leur cycle biologique (21 jours). A l'issue de cette période d'exposition de 21 jours, en fonction de l'espèce testée un ou deux biomarqueur(s) sont mesurés chez les mâles et les femelles pour servir d'indicateurs des effets de la substance chimique d'essai sur l'activité oestrogénique, androgénique ou sur l'inhibition de l'aromatase. Ces biomarqueurs sont la vitellogénine (VTG) et les caractères sexuels secondaires. La vitellogénine est dosée chez le tête-de-boule, le medaka japonais et le poisson-zèbre tandis que les caractères sexuels secondaires sont mesurés chez le tête-de-boule et le medaka japonais uniquement.

3. Ce bio-essai sert d'essai de dépistage *in vivo* pour certains modes d'action liés au système endocrinien, et son application est envisagée dans le contexte du «Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation de perturbateurs endocriniens».

REMARQUES PRÉMIMINAIRES ET LIMITES

4. La vitellogénine (VTG) est normalement produite par le foie des femelles vertébrées ovipares en réponse à la circulation d'œstrogènes endogènes. Il s'agit d'un précurseur des protéines du vitellus, produit par le foie puis acheminé par le sang vers les ovaires, où il est capté et modifié par les ovocytes en croissance. La vitellogénine est quasiment indétectable dans le plasma des poissons mâles et femelles immatures, et ce en raison d'une présence insuffisante d'œstrogènes circulants; néanmoins, le foie peut synthétiser et secréter la vitellogénine en réponse à une stimulation œstrogénique exogène.

▼**M6**

5. Le dosage de la vitellogénine sert à détecter les substances ayant une action (anti-)œstrogénique. Cette détection peut se faire par la mesure de l'induction de vitellogénine chez les poissons mâles; elle a fait l'objet de nombreuses publications scientifiques dans des revues à comité de lecture [(7), par exemple]. L'induction de vitellogénine a également été démontrée suite à une exposition à des androgènes aromatisables (8, 9). La diminution du taux d'œstrogènes circulants chez les femelles sous l'effet, par exemple, de l'inhibition de l'aromatase, l'enzyme permettant de convertir l'androgène endogène en œstrogène naturel (17β-œstradiol), engendre une diminution du niveau de vitellogénine utilisée pour détecter les inhibiteurs d'aromatase (10, 11). La pertinence biologique de la réponse donnée par la vitellogénine suite à l'inhibition des œstrogènes/de l'aromatase est établie et a été abondamment étudiée. Néanmoins la production de VTG chez les femelles peut également être affectée par une toxicité générale et des modes d'action toxiques non-endocriniens (hépatotoxicité, par exemple).

6. Plusieurs méthodes de mesure ont été développées avec succès et normalisées en vue d'essais de routine. Ainsi, le test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) est un principe de reconnaissance immunologique couplé à une réaction enzymatique permettant de doser la vitellogénine à partir de prélèvements sanguins ou hépatiques effectués sur des poissons (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Les échantillons sont prélevés sur trois espèces: le tête-de-boule (sang), le poisson-zèbre (sang ou homogénat tête/queue) et le medaka (foie). Chez le medaka, il existe une bonne corrélation entre la concentration sanguine et la concentration hépatique de VTG (19). Les procédures recommandées pour les prélèvements effectués à des fins de dosage de la vitellogénine sont décrites à l'Appendice 6. Des kits de dosage de la vitellogénine sont largement disponibles; ils sont fondés sur une méthode ELISA validée et spécifique de l'espèce testée.

7. Les caractères sexuels secondaires des poissons mâles de certaines espèces sont visibles à l'œil nu, quantifiables et réactifs aux taux d'androgènes endogènes circulants; c'est le cas pour le tête-de-boule et le medaka mais pas pour le poisson-zèbre, qui ne possède pas de caractères sexuels secondaires quantifiables. Les femelles conservent la capacité de développer des caractères sexuels secondaires masculins en cas d'exposition à des substances androgènes présentes dans l'eau. Un certain nombre d'études scientifiques traitent de ce type de réponse chez le tête-de-boule (20) et le medaka (21). La dégénérescence des caractères sexuels secondaires chez les mâles est interprétée avec prudence en raison de leur faible puissance statistique. Par ailleurs, toute interprétation en la matière est fondée sur un jugement expert et sur l'analyse du poids de la preuve. L'utilisation du poisson-zèbre pour cet essai a ses limites compte tenu de l'absence, chez cette espèce, de caractères sexuels secondaires quantifiables, réactifs aux substances chimiques agissant sur les androgènes.

8. Chez le tête-de-boule, le nombre de tubercules nuptiaux situés sur le museau des femelles constitue le principal indicateur d'exposition à des androgènes exogènes. Chez le medaka femelle, le nombre de tubercules papillaires constitue le principal indicateur d'exposition à des substances androgènes exogènes. Les recommandations sur les procédures à suivre pour évaluer les caractères sexuels secondaires du tête-de-boule et du medaka figurent respectivement à l'Appendice 5A et à l'Appendice 5B.

9. Les définitions utilisées dans la présente méthode d'essai figurent à l'Appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

10. Lors de l'essai, des poissons mâles et femelles en état de se reproduire sont placés ensemble dans des cuves où ils sont exposés à des substances chimiques. Leur état d'adultes reproducteurs permet une différenciation claire entre les deux sexes, et donc une analyse de chaque biomarqueur en fonction du sexe; il garantit également leur sensibilité aux substances

▼**M6**

exogènes. A la fin de l'essai, le sexe est confirmé par un examen macroscopique des gonades après incision de l'abdomen avec des ciseaux. Un tableau récapitulatif des conditions expérimentales pertinentes figure à l'Appendice 2. Pour cet essai on sélectionne normalement des poissons en état de frayer; les animaux sénescents sont écartés. La section relative à la sélection des poissons donne des indications sur l'âge des poissons et sur leur état reproducteur. Trois concentrations d'essai ainsi qu'une cuve témoin contenant de l'eau sont utilisées. Un autre témoin contenant un solvant peut être utilisé si nécessaire. Deux cuves ou répliquats par traitement sont utilisées (chaque cuve contenant 5 mâles et 5 femelles) pour le medaka et le poisson-zèbre; quatre cuves ou répliquats par traitement sont utilisées (chaque cuve comprenant 2 mâles et 4 femelles) pour le tête-de-boule. Ce principe permet de tenir compte du comportement territorial des têtes-de-boule mâles tout en maintenant la puissance de l'essai à un niveau suffisant. La durée d'exposition est de 21 jours; le prélèvement des poissons est effectué le 21^{e} jour.

11. Le 21^{e} jour, tous les poissons sont euthanasiés. Les caractères sexuels secondaires du tête-de-boule et du medaka sont évalués (cf. Appendice 5A et Appendice 5B); des prélèvements sanguins sont effectués pour le dosage de la vitellogénine chez le poisson-zèbre et le tête-de-boule, mais un homogénat tête/queue peut aussi être utilisé pour le dosage de la vitellogénine chez le poisson-zèbre (Appendice 6); des prélèvements hépatiques sont effectués pour le dosage de la VTG chez le medaka (Appendice 6).

CRITÈRES DE VALIDITÉ DE L'ESSAI

12. Pour que les résultats de l'essai soient acceptables, les conditions sont les suivantes:

— La mortalité dans les cuves témoins (eau ou solvant) ne dépasse pas 10 % à la fin de la période d'exposition;

— la concentration d'oxygène dissous est maintenue à 60 % au moins de la valeur de la saturation en air (VSA) durant toute la période d'exposition;

— à aucun moment, durant toute la période d'exposition, la température de l'eau ne diffère de plus de ± 1,5 °C entre les cuves, et elle demeure à l'intérieur d'un intervalle de 2 °C compris dans la plage de température indiquée pour l'espèce étudiée (Appendice 2);

— les données disponibles démontrent que la concentration de la substance chimique d'essai en solution a été correctement maintenue dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

13. On utilise du matériel courant de laboratoire et en particulier:

a) un pH-mètre et un appareil à mesurer l'oxygène;

b) un instrument pour mesurer la dureté et l'alcalinité de l'eau;

c) un dispositif adéquat de régulation de la température avec, de préférence, une surveillance en continu;

d) des cuves en matériau chimiquement inerte et d'une capacité adaptée à la charge et à la densité de peuplement recommandées (Appendice 2);

e) un substrat de frai pour les têtes-de-boule et les poissons-zèbres (voir Appendice 4);

f) une balance suffisamment précise (précision de ± 0,5mg).

▼M6

Eau

14. On utilise une eau dans laquelle l'espèce testée présente des taux adéquats de croissance et de survie à long terme. Sa qualité demeure constante pendant la durée de l'essai. Le pH de l'eau est compris entre 6,5 et 8,5 sans varier de plus de ± 0,5 unité de pH au cours d'un même essai. Pour s'assurer que l'eau de dilution ne modifiera pas le résultat de l'essai (notamment par complexation de la substance chimique d'essai), on prélèvera des échantillons à différents intervalles pour analyse. Le dosage des métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, etc.), des principaux anions et cations (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}, etc.), des pesticides (total des pesticides organophosphorés et organochlorés, etc.), du carbone organique total et des solides en suspension est effectué tous les trois mois, par exemple, pour une eau de dilution dont on sait que sa qualité est relativement constante. Si la qualité de l'eau s'est révélée constante durant au moins un an, on peut espacer les mesures (tous les six mois, par exemple). Certaines caractéristiques chimiques pour une eau de dilution acceptable sont énumérées à l'Appendice 3.

Solutions d'essai

15. Des solutions d'essai sont ajustées à la concentration voulue par dilution d'une solution mère. La solution mère est, de préférence, préparée par simple mélange ou agitation de la substance chimique d'essai dans l'eau de dilution par des moyens mécaniques (secouement ou ultrasons, par exemple). Des colonnes de saturation (colonnes de solubilité) peuvent être utilisées pour réaliser une solution mère de concentration adéquate. L'emploi d'un véhicule solvant n'est pas recommandé mais peut s'avérer nécessaire. Dans ce cas, il faut tester en parallèle une cuve témoin contenant la même concentration de solvant que les cuves contenant la substance. Pour les substances difficiles à tester, un solvant peut être la meilleure solution technique et le Document d'orientation de l'OCDE sur les essais de toxicité aquatique des substances et mélanges «difficiles» devrait être consulté (22). Le choix du solvant est déterminé par les propriétés chimiques de la substance. Le Document d'orientation de l'OCDE recommande de ne pas dépasser une concentration maximale de 100 µl/l. Toutefois une étude récente (23) a montré que l'utilisation de solvants lors des essais de substances ayant des effets sur le système endocrinien pouvait poser d'autres problèmes. Si l'utilisation d'un solvant s'avère nécessaire, il est donc recommandé de réduire sa concentration à un minimum dans toute la mesure des possibilités techniques (qui dépendent des propriétés physicochimiques de la substance chimique d'essai).

16. On utilise un système à écoulement continu On utilise un essai dynamique requérant un système qui délivre et dilue en continu une solution mère de la substance chimique d'essai (pompe doseuse, dilueur proportionnel, système de saturation, par exemple) pour appliquer une série de concentrations dans les enceintes d'essai. Le débit des solutions mères et de l'eau de dilution est vérifié périodiquement, de préférence tous les jours, pendant la durée de l'essai et ne varie pas de plus de 10 % durant l'essai. Il faut veiller à éviter l'utilisation de tubes en plastique de mauvaise qualité ou autres matériaux pouvant contenir des substances chimiques biologiquement actives. Pour la sélection du matériel pour l'essai dynamique, l'adsorption possible de la substance chimique d'essai sur le matériel est prise en compte.

Maintenance des poissons

17. Les poissons d'essai sont sélectionnés parmi une population de laboratoire, issue de préférence d'une même lignée, qui a été acclimatée pendant au moins deux semaines avant l'essai dans des conditions de qualité de l'eau et d'éclairage similaires à celles de l'essai. Il importe que le taux de charge et la densité de peuplement (voir les définitions à l'Appendice 1) soient adaptés à l'espèce testée (voir Appendice 2).

18. Après une période d'acclimatation de 48 heures, on note les mortalités et on applique les critères suivants:

▼M6

— mortalité supérieure à 10 % de la population en sept jours: le lot entier est rejeté;

— mortalité comprise entre 5 et 10 % de la population: la période d'acclimatation est prolongée de sept jours; si la mortalité dépasse 5 % durant la deuxième période de 7 jours, le lot entier est rejeté;

— mortalité inférieure à 5 % de la population en sept jours: le lot est accepté.

19. Les poissons ne reçoivent pas de traitement pour maladie durant les périodes d'acclimatation, de pré-exposition et d'exposition.

Pré-exposition et sélection des poissons

20. Pendant la période de pré-exposition (recommandée d'une semaine), les poissons sont placés dans des cuves similaires à celles de l'essai. Il est préférable de nourrir les poissons *ad libitum* durant toute la période d'acclimatation et d'exposition. La période d'exposition débute avec des adultes sexuellement dimorphes issus d'une population de laboratoire d'animaux sexuellement matures (présentant, par exemple, des caractères sexuels secondaires visibles à l'œil nu en ce qui concerne le tête-de-boule et le medaka), se reproduisant activement. À titre d'orientation générale (ne devant pas être prise en considération indépendamment de l'observation de l'état reproducteur du lot entier), le poisson tête-de- boule est âgé d'environ 20 (± 2) semaines, s'il a bénéficié d'une température de 25 ± 2 °C pendant son élevage; le medaka japonais est âgé d'environ 16 (± 2) semaines, s'il a bénéficié d'une température de 25 ± 2 °C pendant son élevage; et le poisson-zèbre est âgé d'environ 16 (± 2) semaines, s'il a bénéficié d'une température de 26 ± 2 °C pendant son élevage.

CONCEPTION DE L'ESSAI

21. Trois concentrations de la substance chimique d'essai ainsi qu'une cuve témoin (contenant de l'eau) sont utilisées. Un autre témoin contenant un solvant peut être utilisé si nécessaire. Les données peuvent faire l'objet d'analyses statistiques permettant de déceler les différences significatives entre les réponses correspondant à chaque niveau de concentration et au témoin. Plutôt que de servir à l'évaluation des risques, ces analyses sont utiles pour déterminer si la substance chimique doit faire l'objet de tests afin d'évaluer ses éventuels effets néfastes à plus long terme (survie, développement, croissance et reproduction) (24).

22. Pour les espèces medaka et poisson-zèbre, des échantillons sont prélevés le 21ème jour dans les groupes traités à chaque niveau de concentration (chacun des deux répliquats comprenant 5 mâles et 5 femelles) et dans chaque groupe témoin en vue du dosage de la vitellogénine et de l'évaluation des caractères sexuels secondaires, le cas échéant. Pour les têtes-de-boule, des échantillons sont prélevés le 21ème jour dans les groupes traités à chaque niveau de concentration (chacun des quatre répliquats comprenant 2 mâles et 4 femelles) et dans chaque groupe témoin en vue du dosage de la vitellogénine et de l'évaluation des caractères sexuels secondaires.

Sélection des concentrations d'essai

23. Pour les besoins de l'essai, la concentration la plus forte est déterminée en fonction de la concentration maximale tolérée (CMT) obtenue à partir d'un essai préliminaire de détermination des concentrations d'essai ou à partir d'autres données de toxicité, est fixée à 10 mg/l, ou est déterminée en fonction de la solubilité maximale dans l'eau, selon la valeur qui est la plus basse. La CMT est définie comme la concentration d'essai maximale de la substance engendrant un taux de mortalité inférieur à 10 %. L'utilisation de cette approche suppose l'existence de données empiriques sur la toxicité aiguë ou d'autres données de toxicité à partir desquelles la CMT pourra être estimée. L'estimation de la CMT peut être inexacte et requiert généralement un jugement expert.

▼M6

24. Trois concentrations d'essai, espacées par un facteur constant ne dépassant pas 10, et une cuve témoin contenant l'eau de dilution (plus, si nécessaire, une cuve contenant un solvant) sont nécessaires. Les facteurs d'espacement sont situés entre 3,2 et 10.

MODE OPÉRATOIRE

Sélection et pesée des poissons d'essai

25. Il importe de veiller à ce que le poids des poissons varie le moins possible au début de l'essai. L'Appendice 2 indique les gammes de poids qui conviennent aux différentes espèces recommandées pour cet essai. Si possible, au début de l'essai, la gamme des poids de l'ensemble des poissons mâles et femelles du lot utilisé ne sort pas d'un intervalle de ± 20 % autour de la moyenne arithmétique de chaque sexe. On recommande de peser un sous-échantillon de poissons avant l'essai afin d'estimer le poids moyen.

Conditions d'exposition

Durée

26. La durée de l'essai est de 21 jours, après une période de pré-exposition. La durée de préexposition recommandée est d'une semaine.

Alimentation

27. Les poissons reçoivent *ad libitum* une nourriture appropriée (Appendice 2) en quantité suffisante pour maintenir leur condition physique. Il faut veiller à prévenir la prolifération de micro-organismes et la turbidité de l'eau. A titre d'indication générale, la ration quotidienne peut être divisée en deux ou trois parts égales administrées à trois heures d'intervalle au moins. Une seule ration plus conséquente est acceptable, notamment le week-end. Les poissons sont privés de nourriture pendant les 12 heures qui précèdent les prélèvements/l'autopsie.

28. Le dosage des contaminants [pesticides organochlorés, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), biphényles poly chlorés (PCB)] est effectué dans la nourriture. La nourriture présentant une forte concentration de phytœstrogènes qui compromettraient la réponse de l'essai à un agoniste œstrogénique connu (17β œstradiol, par exemple) est évitée.

29. Les aliments non consommés et les matières fécales sont retirés des cuves au moins deux fois par semaine, par un nettoyage soigneux du fond de chaque cuve à l'aide d'un siphon, par exemple.

Lumière et température

30. La photopériode et la température de l'eau sont adaptées à l'espèce testée (voir Appendice 2).

Fréquence des dosages analytiques et des mesures

31. Avant le début de la période d'exposition, le bon fonctionnement du système de distribution de la substance est vérifié. Toutes les méthodes analytiques nécessaires sont établies, y compris des connaissances suffisantes sur la stabilité de la substance dans le système d'essai. Pendant l'essai, les concentrations de la substance chimique d'essai sont déterminées à intervalles réguliers, en vérifiant de préférence chaque jour, mais à défaut au moins deux fois par semaine, le débit du diluant et celui de la solution mère de substance toxique. Ces débits ne varient pas de plus de 10 % pendant toute la durée de l'essai. Il est recommandé de mesurer les concentrations de la substance d'essai dans chaque cuve au début de l'essai puis chaque semaine.

32. Il est recommandé de fonder les résultats sur les concentrations mesurées. Toutefois, si la concentration de la substance chimique d'essai en solution a été correctement maintenue tout au long de l'essai dans un intervalle de ± 20 % autour de la concentration nominale, les résultats peuvent être calculés à partir des valeurs nominales ou mesurées.

33. Les échantillons peuvent avoir besoin d'être filtrés (avec des pores de 0,45 μm, par exemple) ou centrifugés. Si elle est nécessaire, la centrifugation est la procédure recommandée. Cependant, si le matériel d'essai ne s'adsorbe pas sur le filtre, la filtration est également acceptable.

▼M6

34. Pendant l'essai, l'oxygène dissous, la température et le pH sont mesurés dans toutes les cuves au moins une fois par semaine. La dureté totale et l'alcalinité sont mesurées au moins une fois par semaine dans les cuves témoins et dans une cuve contenant la concentration la plus forte. Il est préférable de surveiller la température en continu dans au moins une cuve d'essai.

Observations

35. Un certain nombre de réponses biologiques générales (survie, par exemple) et ciblées par l'essai (niveaux de vitellogénine, par exemple) sont évaluées au cours ou à la fin de l'essai. La mesure et l'évaluation de ces biomarqueurs ainsi que leur utilité sont décrits dans la suite de cette Ligne directrice.

Survie

36. Il convient d'examiner les poissons quotidiennement durant l'essai. Les décès sont notés et les poissons morts retirés de la cuve dès que possible. Les poissons morts ne sont pas remplacés dans les cuves témoins ou les cuves contenant la substance. Le sexe des poissons morts durant l'essai est déterminé par observation macroscopique des gonades.

Comportement et apparence

37. Tout comportement anormal (par rapport aux témoins) est noté, car il peut être un signe de toxicité générale (hyperventilation, nage non coordonnée, perte d'équilibre, immobilité ou alimentation atypiques). Il convient en outre de relever les éventuelles anomalies externes (hémorragie, décoloration, par exemple). La prudence s'impose lors de l'interprétation de ces signes de toxicité dans la mesure où ceux-ci peuvent révéler des concentrations auxquelles les biomarqueurs d'effets potentiels sur le système endocrinien ne sont pas fiables. Ces observations sur le comportement peuvent aussi fournir des informations qualitatives utiles pour les futures exigences potentielles en matière d'essais sur les poissons. On a ainsi pu observer une agressivité territoriale chez les têtes-de-boule mâles normaux ou chez les têtes-de-boule femelles masculinisées en cas d'exposition à des androgènes. Le comportement caractéristique d'accouplement et de reproduction du poisson-zèbre après les premières lueurs de l'aube est réduit ou entravé par l'exposition aux œstrogènes ou aux anti-androgènes.

38. La manipulation des poissons pouvant engendrer une modification rapide de certaines caractéristiques physiques (notamment la couleur), il importe de procéder aux observations qualitatives avant le retrait des poissons du système expérimental. Les expériences menées jusqu'à présent sur le tête-de-boule donnent à penser que certains perturbateurs endocriniens peuvent d'emblée avoir des effets sur les caractéristiques physiques suivantes: couleur (claire ou sombre), motifs de coloration (présence de bandes verticales) et forme du corps (région de la tête et région pectorale). Les observations relatives aux caractéristiques physiques des poissons sont donc notées au cours et à la fin de l'essai.

Euthanasie des poissons

39. Le 21^{e} jour, c'est-à-dire à la fin de la période d'exposition, les poissons sont euthanasiés à l'aide de quantités de tricaïne appropriées [solution de 100-500 mg/l de méthanesulfonate de tricaïne (MS 222) (CAS 886-86-2) tamponnée avec 300 mg/l de $NaHCO_3$ (bicarbonate de sodium, CAS 144-55-8)] destinées à réduire l'irritation de la muqueuse; des prélèvements de sang et de tissus sont ensuite effectués pour le dosage de la vitellogénine (voir la section sur la vitellogénine).

▼**M6**

Observation des caractères sexuels secondaires

40. Certains perturbateurs endocriniens peuvent avoir des effets sur des caractères sexuels secondaires spécialisés (nombre de tubercules nuptiaux chez le tête-de-boule mâle et de tubercules papillaires chez le medaka mâle). Certaines substances peuvent notamment engendrer l'apparition anormale de caractères sexuels secondaires chez les animaux du sexe opposé. Ainsi les agonistes des récepteurs d'androgènes tels que le trenbolone, la méthyltestostérone et la dihydrotestostérone peuvent provoquer l'apparition de tubercules nuptiaux proéminents chez le tête-de-boule femelle et celle de tubercules papillaires chez le medaka femelle (20, 11, 21). On a pu noter également que les agonistes des récepteurs d'œstrogènes peuvent réduire le nombre de tubercules nuptiaux et la taille de l'amas graisseux situé sur la tête des adultes mâles de tête-de-boule (25, 26). Ces observations morphologiques macroscopiques peuvent fournir des informations qualitatives et quantitatives utiles pour fonder d'éventuelles exigences futures en matière d'essais sur les poissons. Le nombre et la taille des tubercules nuptiaux chez le tête-de-boule ainsi que ceux des tubercules papillaires chez le medaka peuvent être quantifiés directement, ou de manière plus pratique sur des spécimens préservés. Les recommandations sur les procédures applicables pour l'évaluation des caractères sexuels secondaires du tête-de-boule et du medaka figurent respectivement à l'Appendice 5A et à l'Appendice 5B.

Vitellogénine (VTG)

41. Un prélèvement sanguin est effectué dans l'artère / la veine caudale grâce à un tubule capillaire à microhématocrite héparinisé ou par ponction cardiaque avec une seringue. Selon la taille du poisson, les volumes sanguins prélevés sont généralement de 5 à 60 µl par individu pour les têtes-de-boule et de 5 à 15 µl par individu pour les poissons-zèbres. Le plasma est séparé du sang par centrifugation avant d'être stocké avec des inhibiteurs de protéase à – 80 °C jusqu'à son analyse pour le dosage de la vitellogénine. Chez le medaka, un prélèvement hépatique est utilisé; chez le poisson-zèbre, un homogénat tête/queue peut être utilisé comme échantillon tissulaire pour le dosage de la vitellogénine (Appendice 6). Le dosage de la VTG est effectué à l'aide d'une méthode ELISA homologue validée en utilisant des anticorps homologues et un standard de VTG homologue. Il est recommandé d'utiliser une méthode capable de détecter des concentrations de VTG de quelques ng/ml de plasma (ou ng/mg de tissus) seulement, correspondant à la concentration de fond chez les poissons mâles non exposés.

42. Le contrôle qualité de l'analyse de la vitellogénine se fait par le biais de solutions-étalons, de blancs et, au minimum, d'analyses dédoublées. Pour chaque méthode ELISA, l'effet de matrice (effet de la dilution de l'échantillon) est testé afin de déterminer le facteur de dilution minimale de l'échantillon. Chaque plaque ELISA utilisée pour le dosage de la VTG comporte les échantillons de contrôle qualité suivants: au moins six solutions-étalons couvrant la plage des concentrations attendues de vitellogénine, et au moins un blanc d'essai de liaison non spécifique (en analyse dédoublée). L'absorbance de ces blancs est inférieure à 5 % de l'absorbance maximale des solutions-étalons. Au moins deux aliquotes (puits dédoublés) de chaque dilution de l'échantillon sont analysés. Les puits dédoublés qui diffèrent de plus de 20 % font l'objet d'une nouvelle analyse.

43. Le coefficient de corrélation (R^2) des courbes d'étalonnage est supérieur à 0,99. Toutefois une corrélation élevée ne suffit pas à garantir la prédiction adéquate de la concentration pour toutes les plages de concentration. En plus d'obtenir une corrélation suffisamment élevée pour la courbe d'étalonnage, la concentration de chaque solution-étalon, calculée à partir de la courbe d'étalonnage, est comprise entre 70 et 120 % de sa concentration

▼M6

nominale. Si les concentrations nominales ont tendance à s'éloigner de la droite de régression de l'étalonnage (à des concentrations plus faibles, par exemple), il peut s'avérer nécessaire de partager la courbe d'étalonnage en deux plages, l'une forte et l'autre faible, ou d'utiliser un modèle non linéaire pour ajuster correctement les données relatives à l'absorbance. Si la courbe est partagée, les deux segments de droite doivent avoir un coefficient de corrélation $R^2 > 0,99$.

44. La limite de détection (LDD) est définie comme la limite en deçà de laquelle la concentration est trop faible pour que la substance soit détectée, et la limite de quantification (LDQ) est définie comme la limite en deçà de laquelle la concentration est trop faible pour que la substance soit détectée, multipliée par le facteur de dilution le plus faible.

45. Chaque jour où des essais portant sur la vitellogénine sont réalisés, un échantillon fortifié obtenu à partir d'un étalon de référence inter-essais sera analysé (Appendice 7). On notera alors systématiquement le rapport entre la concentration attendue et la concentration mesurée avec les résultats de chaque série d'essais effectués ce jour-là.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation de la réponse des biomarqueurs par l'analyse de la variance (ANOVA)

46. Pour identifier les effets potentiels d'une substance sur le système endocrinien, on compare les réponses des groupes traités et des groupes témoins en utilisant l'analyse de la variance (ANOVA). Si un témoin contenant un solvant est utilisé, une analyse statistique appropriée du témoin contenant l'eau de dilution et du témoin contenant le solvant est effectuée pour chaque effet observé. On trouvera dans OCDE (2006c) (27) des orientations sur le traitement des données relatives au témoin contenant l'eau de dilution et au témoin contenant le solvant lors de l'analyse statistique ultérieure. Les réponses biologiques obtenues sont analysées et notées séparément pour chaque sexe. Si les hypothèses requises concernant les méthodes paramétriques ne se vérifient pas — distribution non normale (par exemple test de Shapiro-Wilk) ou variance hétérogène (test de Bartlett ou de Levene) — il faudra envisager de transformer les données pour homogénéiser les variances avant de réaliser l'ANOVA ou de conduire une analyse pondérée de la variance. Le test de Dunnett (paramétrique) permettant de multiples comparaisons par paires ou le test de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni (non paramétrique) peuvent être utilisés pour une relation dose-réponse non monotone. D'autres tests statistiques peuvent être utilisés (test de Jonckheere-Terpstra ou de Williams) si la relation dose-réponse est approximativement monotone. Un ordinogramme d'analyse statistique figure à l'Appendice 8. Cet outil d'aide à la décision permet de choisir le test statistique le plus approprié. Le document de l'OCDE sur les méthodes actuelles d'analyse statistique des données d'écotoxicité (27) fournit d'autres informations en la matière.

Communication des résultats des essais

47. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Installation d'essai:

— Personnel chargé de l'étude et responsabilités de chacun;

— Chaque laboratoire a démontré sa compétence sur une gamme de substances chimiques représentatives;

Substance chimique d'essai:

— Caractérisation de la substance chimique d'essai

— Nature physique et propriétés physico-chimiques pertinentes;

▼**M6**

— Méthode et fréquence de préparation des concentrations d'essai;

— Informations sur la stabilité et la biodégradabilité;

Solvant:

— Caractérisation du solvant (nature, concentration utilisée);

— Justification du choix du solvant (si autre que l'eau);

Animaux d'expérience:

— Espèce et souche;

— Fournisseur et équipements particuliers du fournisseur;

— Âge des poissons au début de l'essai et état reproducteur;

— Informations détaillées sur la procédure d'acclimatation des animaux;

— Poids corporel des poissons au début de l'exposition (déterminé à partir d'un sous-échantillon issu de la population de poissons);

Conditions de l'essai:

— Méthode utilisée (type d'essai, taux de charge, densité de peuplement, etc.);

— Méthode de préparation des solutions mères et débit;

— Concentrations d'essai nominales, dosage hebdomadaire de la concentration des solutions d'essai et méthode analytique utilisée, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types dans les cuves d'essai et données montrant que les mesures se réfèrent aux concentrations de la substance chimique d'essai en solution vraie;

— Caractéristiques de l'eau de dilution (pH, dureté, alcalinité, température, concentration d'oxygène dissous, teneurs résiduelles en chlore, carbone organique total, solides en suspension et toute autre mesure effectuée);

— Qualité de l'eau dans les cuves d'essai: pH, dureté, température et concentration d'oxygène dissous;

— Informations détaillées sur l'alimentation (par exemple type d'aliments, provenance, quantité donnée et fréquence) et analyse des contaminants pertinents (PCB, HAP et pesticides organochlorés, par exemple);

Résultats:

— Données montrant que les témoins remplissent les critères de validité de l'essai;

— Données sur la mortalité pour chaque concentration d'essai et chaque témoin;

— Techniques d'analyse statistique appliquées, traitement des données et justification des méthodes utilisées;

— Données sur les observations biologiques de morphologie macroscopique, y compris les caractères sexuels secondaires et la vitellogénine;

▼M6

— Résultats des analyses de données, de préférence sous forme de tableaux et de graphiques;

— Fréquence des réactions inhabituelles des poissons et des effets visibles produits par la substance chimique d'essai.

ORIENTATIONS POUR L'INTERPRÉTATION ET L'ACCEPTATION DES RÉSULTATS DE L'ESSAI

48. Cette partie traite des paramètres à prendre en compte pour l'interprétation des résultats de l'essai en ce qui concerne les différents effets mesurés. Les résultats sont interprétés avec prudence lorsque la substance chimique d'essai semble provoquer des signes de toxicité manifestes ou avoir des effets sur l'état général de l'animal d'expérience.

49. Lors de l'essai préliminaire de détermination des concentrations d'essai, on veillera à ne pas dépasser la concentration maximale tolérée pour pouvoir interpréter les données de façon fiable. Il importe d'appliquer au moins un traitement qui ne provoque aucun signe d'effets toxiques. Les symptômes de maladie et les signes d'effets toxiques font l'objet d'une évaluation et d'un rapport détaillés. Il est possible, par exemple, que la production de VTG chez les femelles soit également affectée par une toxicité générale et des modes d'action toxiques non liés au système endocrinien (hépatotoxicité, par exemple). Toutefois l'interprétation des effets peut être renforcée par d'autres niveaux de traitement dont les effets ne sont pas perturbés par la toxicité systémique.

50. Quelques paramètres sont pris en compte pour l'acceptation des résultats de l'essai. A titre indicatif, les niveaux de VTG sont distincts chez les mâles et les femelles témoins, et séparés d'au moins trois ordres de grandeur chez le tête-de-boule et le poisson-zèbre et d'un ordre de grandeur chez le medaka. Des exemples de la gamme des valeurs relevées dans les groupes témoins et les groupes traités sont disponibles dans les rapports de validation (1, 2, 3, 4). Des valeurs élevées de VTG chez les mâles des groupes témoins peuvent compromettre la performance de l'essai et sa capacité de détection des agonistes des œstrogènes de faible puissance. Des valeurs de VTG basses chez les femelles témoins peuvent compromettre la performance de l'essai et sa capacité de détection des inhibiteurs de l'aromatase et des antagonistes des œstrogènes. Les études de validation ont été utilisées pour la rédaction de ces orientations.

51. Si un laboratoire n'a pas procédé à cet essai auparavant ou s'il a procédé à des modifications substantielles (changement de souche ou de fournisseur de poissons, par exemple), il est conseillé de faire un essai pour vérifier la compétence technique. Il est recommandé d'utiliser des substances représentant une gamme de modes d'action ou d'impacts sur certains des paramètres mesurés durant l'essai. En pratique, chaque laboratoire est encouragé à constituer ses propres données de contrôle historiques pour les mâles et les femelles, et à faire un essai avec un témoin positif de l'activité œstrogénique (par exemple, 17β-œstradiol à 100 ng/l/1, ou un agoniste faible connu) engendrant une augmentation de la VTG chez les mâles, un témoin positif de l'inhibition de l'aromatase (fadrozole ou prochloraz à 300 µg/l, par exemple) engendrant une diminution de la VTG chez les femelles, et un témoin positif de l'activité androgénique (17β-trenbolone à 5 µg/l, par exemple) engendrant l'induction de caractères sexuels secondaires chez les femelles tête-de-boule et medaka. Toutes ces données peuvent être comparées aux données disponibles issues des études de validation (1, 2, 3) pour garantir la compétence du laboratoire.

52. En général, les mesures de la vitellogénine sont considérées comme positives en cas d'augmentation statistiquement significative de la VTG chez les mâles ($p < 0,05$) ou de baisse statistiquement significative chez les femelles ($p < 0,05$), et ce au moins à la concentration maximale soumise à l'essai par rapport au groupe témoin, et en l'absence de signes de toxicité générale. Un résultat positif est en outre confirmé par la démonstration d'une relation dose-réponse biologiquement plausible. Comme mentionné précédemment, la baisse de la vitellogénine peut ne pas être entièrement liée au système endocrinien; toutefois un résultat positif est en général interprété comme un élément de preuve d'une activité du système endocrinien *in vivo*, et motive normalement des actions visant à une clarification plus poussée

▼**M6**

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE — Série sur les essais et l'évaluation, n° 60, ENV/JM/M0N0(2006)27.

(2) OCDE (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1 B). Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE — Série sur les essais et l'évaluation, n° 61, ENV/JM/M0N0(2006)29.

(3) OCDE (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et l'évaluation, nO 78, ENV/JM/M0N0(2007)25.

(4) 0wens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the 0ECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (accessed 18/09/08).

(5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Rapport non publié daté du 15 décembre 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.

(6) OCDE, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE — Série sur les essais et l'évaluation n° 94, ENV/JM/M0N0(2008)21.

(7) Sumpter et Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives;103 Suppl 7:173-8 Review.

(8) Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, Braunbeck T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.

(9) Andersen L, Goto-Kazato R, Trant JM, Nash JP, Korsgaard B, Bjerregaard P (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

(10) Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (Pimephalespromelas). Toxicological Sciences;67(1): 121-30.

(11) Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

(12) Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999). Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

▼**M6**

(13) Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (Pimephales promelas) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Bruxelles, Belgique.

(14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (Danio rerio Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

(15) Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131

(16) Rose J, Holbech H, Lindholst C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17β-estradiol and 17β-ethinylestradiol in male zebrafish (Danio rerio). Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531-539.

(17) Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.

(18) Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang IJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (Oryzias latipes). Jpn J Environ Toxicol 4:87-98.

(19) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50:301308.

(20) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Homung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.

(21) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K (2004). Fish full life- cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (Oryzias latipes). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774-81.

(22) OCDE (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publications Hygiène et sécurité de l'environnement de l'OCDE. — Série sur les essais et l'évaluation n° 23 Paris

(23) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.6992.

(24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as «signposts», not «traffic lights,» in risk assessment. Environmental Health Perspectives;114 Suppl 1:106-14.

(25) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17β-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (Pimephales promelas). Aquat. Toxicol. 47, 129-145.

▼**M6**

(26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve and G.T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478-488.

(27) OCDE (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et l'évaluation n° 54. ENV/JM/M0N0(2006)18.

(28) OCDE (2012) Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation de perturbateurs endocriniens (version révisée). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Série sur les essais et l'évaluation n° 150 ENV/JM/M0N0(2012)22.

▼**M6**

Appendice 1

Abréviations & définitions

Substance chimique: une substance ou un mélange

CV: coefficient de variation

ELISA: (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay): procédé immunochimique d'absorption enzymatique

Taux de charge: poids frais de poissons par unité de volume d'eau

Densité de peuplement: nombre de poissons par unité de volume d'eau

Vitellogénine (VTG): lipo-glyco-phospho-protéine précurseur des protéines du vitellus normalement produite par les femelles sexuellement actives de toutes les espèces ovipares

Axe HHG: axe hypothalamo-hypophyso-gonadique

CMT: concentration maximale tolérée représentant environ 10 % de la CL_{50}

Substance chimique d'essai: Toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼**M6**

Appendice 2

Conditions expérimentales du protocole de dépistage des substances agissant sur le système endocrinien des poissons non reproducteurs

1. Espèces recommandées	**Tête-de-boule** (*Pimephales promelas*)	**Medaka** (*Oryzias latipes*)	**Poisson-zèbre** (*Danio rerio*)
2. Type d'essai	dynamique	dynamique	dynamique
3. Température de l'eau	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Qualité de l'éclairage	Ampoules fluorescentes (à large spectre)	Ampoules fluorescentes (à large spectre)	Ampoules fluorescentes (à large spectre)
5. Intensité de l'éclairage	10-20 µE/m^2/s, 540-1 000 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire)	10-20 µE/m^2/s, 540-1 000 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire)	10-20 µE/m^2/s, 540-1 000 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire)
6. Photopériode (transitions — aube et crépuscule — optionnelles, mais non considérées comme nécessaires)	16 h de lumière, 8 h d'obscurité	12-16 h de lumière, 12-8 h d'obscurité	12-16 h de lumière, 12-8 h d'obscurité
7. Taux de charge	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Volume des enceintes d'essai	10 l (minimum)	2 l (minimum)	5 l (minimum)
9. Volume de la solution d'essai	8 l (minimum)	1,5 l (minimum)	4 l (minimum)
10. Remplacement volumique des solutions d'essai	Minimum 6 fois/jour	Minimum 5 fois/jour	Minimum 5 fois/jour
11. Âge des organismes d'essai	voir paragraphe 20	voir paragraphe 20	voir paragraphe 20
12. Poids frais approximatif des poissons adultes (g)	Femelles: 1,5 ± 20 % Mâles: 2,5 ± 20 %	Femelles: 0,35 ± 20 % Mâles: 0,35 ± 20 %	Femelles: 0,65 ± 20 % Mâles: 0,4 ± 20 %
13. Nombre de poissons par cuve	6 (2 mâles et 4 femelles)	10 (5 mâles et 5 femelles)	10 (5 mâles et 5 femelles)
14. Nombre de traitements	= 3 (plus témoins appropriés)	= 3 (plus témoins appropriés)	= 3 (plus témoins appropriés)
15. Nombre de cuves par traitement	4 minimum	2 minimum	2 minimum
16. Nombre de poissons par concentration d'essai	16 adultes femelles et 8 mâles (4 femelles et 2 mâles dans chaque réplicat)	10 adultes femelles et 10 mâles (5 femelles et 5 mâles dans chaque réplicat)	10 adultes femelles et 10 mâles (5 femelles et 5 mâles dans chaque réplicat)
17. Régime alimentaire	Artémies adultes ou nauplies d'artémies, vivantes ou congelées, deux ou trois fois par jour (ad libitum), nourriture disponible dans le commerce ou combinaison de ces éléments	Nauplies d'artémies, vivantes ou congelées, deux ou trois fois par jour (ad libitum), nourriture disponible dans le commerce ou combinaison de ces éléments	Nauplies d'artémies deux ou trois fois par jour (ad libitum), nourriture disponible dans le commerce ou combinaison de ces éléments

▼M6

18. Aération	Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 60 % de la valeur de la saturation en air (VSA)	Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 60 % de la valeur de la saturation en air (VSA)	Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 60 % de la valeur de la saturation en air (VSA)
19. Eau de dilution	Eau de surface, de puits ou reconstituée, ou eau du robinet déchlorée	Eau de surface, de puits ou reconstituée, ou eau du robinet déchlorée	Eau de surface, de puits ou reconstituée, ou eau du robinet déchlorée
20. Période de préexposition	7 jours (recommandé)	7 jours (recommandé)	7 jours (recommandé)
21. Durée de l'exposition au produit chimique	21 jours	21 jours	21 jours
22. Effets biologiques mesurés	survie comportement caract. sexuels secondaires VTG	survie comportement caract. sexuels secondaires VTG	survie comportement VTG
23. Critères de validité de l'essai	Concentration d'oxygène dissous > 60 % de la VSA; température moyenne de 25 ± 2 °C; 90 % de survie dans les groupes témoins; concentration mesurée de la substance d'essai maintenue dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées pour chaque niveau de traitement	Concentration d'oxygène dissous > 60 % de la VSA; température moyenne de 24 ± 2 °C; 90 % de survie dans les groupes témoins; concentration mesurée de la substance d'essai maintenue dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées pour chaque niveau de traitement	Concentration d'oxygène dissous > 60 % de la VSA; température moyenne de 26 ± 2 °C; 90 % de survie dans les groupes témoins; concentration mesurée de la substance d'essai maintenue dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées pour chaque niveau de traitement

▼**M6**

Appendice 3

Quelques caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable

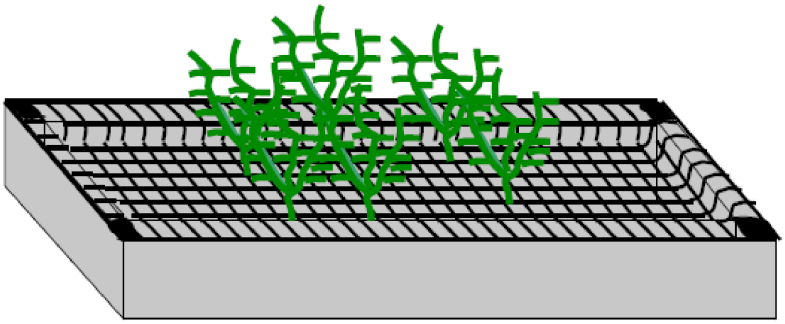
Constituant	Concentrations
Matières particulaires	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	< 50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

▼M6

Appendice 4 A

Substrat de frai pour les poissons-zèbres

Plateau de frai: plat à instruments en verre, mesurant par exemple 22 × 15 × 5.5 cm (L × l × h), recouvert d'une grille amovible en acier inoxydable (mailles de 2 mm de largeur). La base de cette grille se trouve plus bas que le bord du plat à instruments.



Le substrat de frai est fixé sur la grille. Il forme une structure dans laquelle les poissons peuvent pénétrer. Des plantes d'aquarium artificielles en plastique vert, par exemple, peuvent convenir (NB: l'adsorption possible de la substance chimique d'essai sur la matière plastique est prise en compte). Le plastique est lessivé dans un volume suffisant d'eau chaude et pendant un temps suffisant pour qu'aucune substance ne risque de se retrouver dans la solution d'essai. Si des objets en verre sont utilisés, on veille à ce que les poissons ne soient ni blessés ni entravés lors de mouvements vigoureux.

La distance entre le plateau et les parois de la cuve est d'au moins 3 cm pour que le frai ne se fasse pas à l'extérieur du plateau. Les œufs déposés sur le plateau traversent la grille et peuvent être prélevés 45 à 60 minutes après le début de l'éclairage. Les œufs translucides n'adhèrent pas et peuvent facilement être comptés grâce une lumière transversale. Pour cinq femelles par cuve, le nombre d'œufs pondus peut être considéré comme faible s'il est inférieur ou égal à 20 par jour, moyen s'il est compris entre 20 et 100, et élevé s'il est supérieur à 100. Le plateau de frai est retiré, les œufs ramassés et le plateau de frai réintroduit dans la cuve d'essai, le plus tard possible dans la soirée ou bien très tôt le matin. La réintroduction du plateau se fait dans un délai maximum d'une heure car sinon le signal du substrat de frai peut induire un accouplement et un frai à un moment inhabituel. Si la situation nécessite une introduction ultérieure du plateau de frai, il faut attendre au moins neuf heures après le début de l'éclairage. A cette heure tardive de la journée, l'induction de frai ne se fait plus.

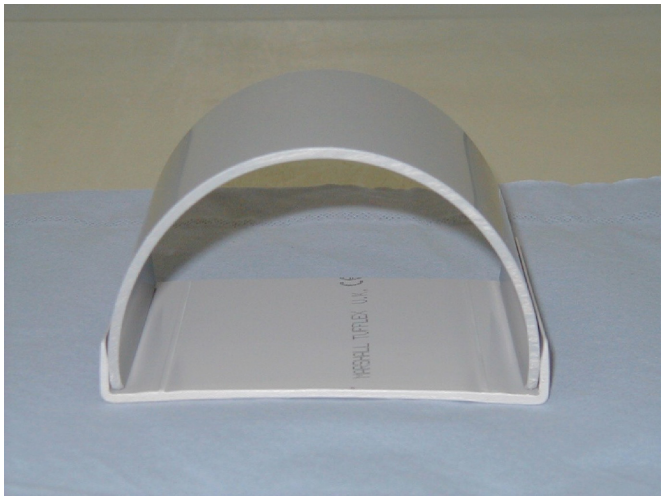
▼**M6**

Appendice 4 B

Substrat de frai pour les têtes-de-boule

Deux ou trois plaques et plateaux de frai en plastique/céramique/verre ou en acier inoxydable combinés sont placés dans chaque enceinte d'essai (morceau de gouttière semi-circulaire grise de 80 mm de longueur posé sur un plateau à rebords de 130 mm de long, par exemple) (voir photo). Il est avéré que les plaques en PVC ou en céramique vieillies pouvaient convenablement servir de substrat de frai (Thorpe *et al*, 2007).

Il est recommandé d'utiliser des plaques abrasées pour améliorer l'adhérence. Le plateau est aussi muni d'un écran de protection empêchant les poissons d'accéder aux œufs tombés, à moins que l'efficacité de l'adhérence des œufs ait été démontrée pour le substrat de frai utilisé.



Le socle est conçu pour contenir tous les œufs qui n'adhèrent pas à la surface des plaques et tomberaient donc au fond de l'enceinte (ou les œufs déposés directement sur le socle en plastique plat). Tous les substrats de frai sont lessivés pendant au moins 12 heures dans l'eau de dilution avant leur utilisation.

RÉFÉRENCES

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. Aquatic Toxicology, 81, 90-98.

▼M6

Appendice 5 A

Évaluation des caractères sexuels secondaires du tête-de-boule pour la détection de certains perturbateurs endocriniens

Synthèse

Chez les têtes-de-boule adultes, les caractéristiques physiques pouvant avoir de l'importance dans les essais de perturbateurs endocriniens sont les suivantes: couleur (claire/sombre), motifs de coloration (présence ou absence de bandes verticales), forme du corps (région de la tête et région pectorale, distension de l'abdomen) et caractères sexuels secondaires spécifiques de l'espèce (nombre et taille des tubercules nuptiaux, taille du bourrelet dorsal et ovipositeur).

Les tubercules nuptiaux sont situés sur la tête (bourrelet dorsal) des têtes-de-boule adultes mâles reproducteurs, et sont généralement disposés bilatéralement et symétriquement (Jensen et al. 2001). Les femelles et les juvéniles mâles et femelles des cuves témoins ne développent pas de tubercule (Jensen et al. 2001). Il est possible de dénombrer jusqu'à huit tubercules individuels autour des yeux et entre les narines des mâles. Les tubercules les plus importants en nombre et en taille forment deux lignes parallèles situées juste en dessous des narines et au-dessus de la bouche. De nombreux poissons possèdent des groupes de tubercules sous la mâchoire inférieure; tout près de la bouche on en trouve généralement une seule paire alors que le ventre peut comprendre jusqu'à quatre tubercules. Le nombre de tubercules dépasse rarement 30 (fourchette, 18-28; Jensen et al. 2001). Les tubercules les plus nombreux forment une seule et même structure de forme plutôt arrondie, dont la hauteur est à peu près égale au rayon. Chez la plupart des mâles reproducteurs, certains tubercules sont si étendus et protubérants qu'il est impossible de les distinguer les uns des autres.

Certains types de perturbateurs endocriniens peuvent provoquer l'apparition anormale de caractères sexuels secondaires chez le sexe opposé; ainsi, les agonistes des récepteurs d'androgènes tels que la 17β-méthyltestostérone ou le 17ß-trenbolone peuvent provoquer l'apparition de tubercules nuptiaux chez le tête-de-boule femelle (Smith, 1974; Ankley *et al.*, 2001, 2003), tandis que les agonistes des récepteurs d'œstrogènes peuvent réduire le nombre ou la taille des tubercules nuptiaux chez les mâles (Miles-Richardson et al, 1999; Harries et al., 2000).

On trouvera ci-après une description de la caractérisation des tubercules nuptiaux chez les têtes-de-boule, fondée sur le mode opératoire utilisé par le laboratoire de l'Agence pour la protection de l'environnement des États-Unis (USEPA) à Duluth, Minnesota. Les produits et/ou équipements spécifiques peuvent être remplacés par des matériaux comparables disponibles.

L'utilisation d'une loupe à éclairage ou d'un microscope binoculaire de dissection à éclairage (3X) permet une observation optimale. On observera le poisson en position dorsale, partie antérieure vers l'avant (tête vers l'observateur).

a) Placer le poisson dans une petite boîte de Pétri (100 mm de diamètre, par exemple), sur le dos, partie antérieure vers l'avant. Régler le viseur pour pouvoir identifier les tubercules. Faire rouler doucement le poisson d'un côté puis de l'autre pour identifier les zones où se trouvent les tubercules. Compter et classer les tubercules.

b) Renouveler l'observation sur la partie ventrale antérieure après avoir placé le poisson sur le dos, partie antérieure vers l'avant, dans la boîte de Pétri.

c) Les observations ne prennent pas plus de 2 minutes par poisson.

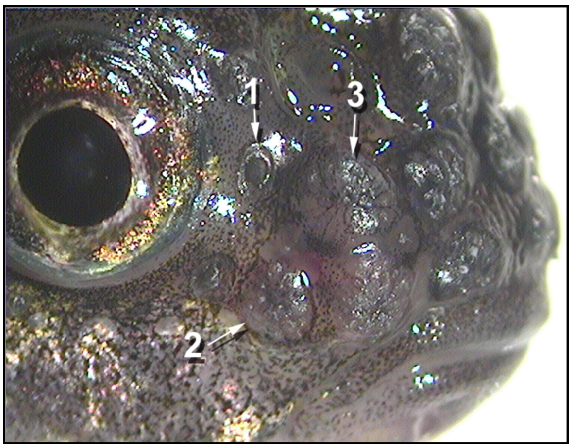
▼M6

Dénombrement et classement des tubercules

Six zones spécifiques ont été identifiées pour l'évaluation de la présence et du développement de tubercules chez les têtes-de-boule adultes. Une matrice a été créée pour cartographier la localisation des tubercules et la quantité de tubercules présents (voir fin du présent Appendice). Le nombre de tubercules est consigné, et les tubercules peuvent être classés comme suit en fonction de leur taille: 0-absence, 1-présent, 2-agrandi et 3-protubérant pour chaque organisme (Figure 1).

Classe 0-absence de tout tubercule. Classe 1-tubercule présent, identifié comme tout tubercule dont un seul point est de hauteur presque égale à son rayon (diamètre). Classe 2-tubercule agrandi, identifié par des tissus ressemblant à un astérisque, présentant généralement une large base radiale marquée de stries et de sillons partant du centre. La hauteur des tubercules est souvent plus irrégulière mais peut parfois être un peu arrondie. Classe 3-tubercule protubérant, de forme généralement plutôt large et arrondie et de structure moins bien définie. Ces tubercules s'agglomèrent parfois pour former une seule et même masse le long d'une zone ou de plusieurs zones (B, C et D, voir description ci-dessous). Leur couleur et leur forme sont similaires à celles de la classe 2, mais sont parfois assez indéterminées. Ce système de classement permet généralement d'obtenir un résultat global < 50 chez un mâle témoin normal possédant un nombre de tubercules compris entre 18 et 20 (Jensen et al. 2001).

Figure 1



Certains poissons peuvent présenter plus de tubercules que la matrice ne compte de cases (voir appendice A) pour une zone particulière. Dans ce cas, des chiffres supplémentaires peuvent être indiqués à l'intérieur, à droite ou à gauche de la case. La matrice n'a donc pas besoin d'afficher une symétrie. Une autre technique permettant de cartographier les tubercules allant par paires ou réunis verticalement le long du plan horizontal de la bouche pourrait consister à indiquer deux chiffres dans une seule case.

Zones cartographiées:

A — Tubercules situés autour des yeux. Localisés de dorsal à ventral autour du bord antérieur des yeux. Couramment multiples chez les mâles témoins mûrs, absents chez les femelles témoins, généralement par paires (un près de chaque œil) ou uniques chez les femelles exposées à des androgènes.

B — Tubercules situés entre les narines (pores-canaux sensoriels). Normalement par paires chez les mâles témoins à des niveaux de développement supérieurs (2-agrandi ou 3-protubérants). Absents chez les femelles témoins mais parfois présents chez les femelles exposées à des androgènes.

C — Tubercules situés immédiatement devant les narines, parallèlement à la bouche. Généralement agrandis ou protubérants chez les mâles témoins mûrs. Présents ou agrandis chez les mâles moins développés ou chez les femelles exposées à des androgènes.

▼**M6**

D — Tubercules situés parallèlement à la bouche. Généralement classés «développés» chez les mâles témoins. Absents chez les femelles témoins mais présents chez les femelles exposées à des androgènes.

E — Tubercules situés sur la mâchoire inférieure, près de la bouche, généralement petits et par paires. Variables chez les mâles témoins ou traités et chez les femelles traitées.

F — Tubercules situés sous la zone E. Généralement petits et par paires. Présents chez les mâles témoins et chez les femelles exposées à des androgènes.

RÉFÉRENCES

(1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.

(2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Homung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environ Toxicol Chem 22:1350-1360.

(3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA,Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (Pimephales promelas). Environ Sci Technol 34:3003-3011.

(4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (Pimephalespromelas). Comp Biochem Physiol C 128:127-141.

(5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. J Fish Biol 59:515-523.

(6) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17D-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (Pimephalespromelas). Aquat Toxicol 47:129-145.

(7) Smith RJF. 1974. Effects of 17D-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (Pimephales promelas). Can J Zool 52:1031-1038.

Matrice pour la cartographie des tubercules

N° ident. _____

Date _____

Score total _____

Classification numérique

1-présent

2-agrandi

3-protubérant

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
				E	**X1**	**X1**					
				F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**			

▼M6

Appendice 5 B

Évaluation des caractères sexuels secondaires du medaka pour la détection de certains perturbateurs endocriniens

La mesure des tubercules papillaires (*), qui sont les caractères sexuels secondaires du medaka (*Oryzias latipes*) est décrite ci-après.

(*) Les tubercules papillaires sont normalement présents uniquement chez les mâles adultes, et se situent entre le deuxième et le septième ou le huitième rayon de nageoire en comptant à partir de l'extrémité postérieure de la nageoire anale (fig.1 et 2). Ils apparaissent rarement sur le premier rayon en comptant à partir de l'extrémité postérieure de la nageoire anale. Cette procédure opératoire standard (POS) permet de mesurer les tubercules présents sur le premier rayon de nageoire (le numéro du rayon est déterminé en comptant à partir de l'extrémité postérieure de la nageoire anale dans cette POS).

1) Après excision du foie (Appendice 6), la carcasse est placée dans un tube conique contenant 10 ml environ de formol tamponné à 10 % (tête en haut, queue en bas). Si la gonade est fixée dans une autre solution que du formol tamponné à 10 %, pratiquer à l'aide d'un rasoir une incision transversale dans la carcasse entre la région antérieure de la nageoire anale et l'anus, en prenant soin de ne pas abîmer le gonopore et la gonade (fig. 3). Placer la partie tête du corps du poisson dans la solution de fixation pour préserver la gonade, et la partie queue dans du formol tamponné à 10 % tel que décrit ci-dessus.

2) Après avoir placé le poisson dans du formol tamponné à 10 %, saisir la région antérieure de la nageoire anale avec des pincettes et la plier pendant une trentaine de secondes pour que la nageoire anale reste ouverte. En prenant la nageoire anale avec les pincettes, saisir quelques rayons de nageoire dans la région antérieure en prenant soin de ne pas abîmer les tubercules papillaires.

3) Après avoir maintenu la nageoire anale ouverte pendant une trentaine de secondes, placer le poisson dans du formol tamponné à 10 % à température ambiante jusqu'à la mesure des tubercules papillaires (cette mesure est effectuée au bout de 24 heures minimum).

Mesure

1) Après avoir fixé le poisson dans le formol tamponné à 10 % pendant au moins 24 heures, retirer la carcasse du tube conique et essuyer le formol avec du papier filtre (ou essuie-tout).

2) Placer le poisson abdomen vers le haut. Découper ensuite soigneusement la nageoire anale avec de petits ciseaux à dissection (il est préférable de découper la nageoire anale avec un peu de rayon endosquelettique).

3) Saisir la région antérieure de la nageoire anale excisée avec des pincettes et la poser sur une lame de verre avec quelques gouttes d'eau. Couvrir ensuite la nageoire anale avec une lamelle couvre-objet. Prendre soin de ne pas abîmer les tubercules papillaires en prenant la nageoire anale avec les pincettes.

4) Noter le nombre de plaques conjointes présentant des tubercules papillaires à l'aide du compteur placé sous un microscope biologique (microscope droit ou microscope inversé). On reconnaît les tubercules papillaires à la petite formation de tubercules visible sur le côté postérieur des plaques conjointes. Inscrire sur la feuille de travail le nombre de plaques conjointes présentant

▼**M6**

des tubercules papillaires pour chaque rayon de nageoire (premier rayon: 0, deuxième rayon: 10, troisième rayon: 12, etc.) puis inscrire leur somme sur la feuille Excel pour chaque poisson. Si nécessaire, photographier la nageoire anale et noter le nombre de plaques conjointes présentant des tubercules papillaires sur la photo.

5) Après la mesure, placer la nageoire anale dans le tube conique décrit au point 1) et le stocker.

Fig.1.

Schéma illustrant la différence de forme et de taille de la nageoire anale entre les sexes. A, mâle; B, femelle. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

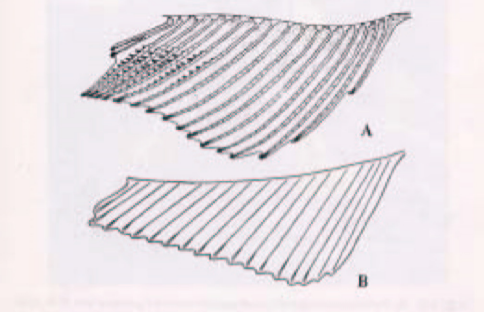
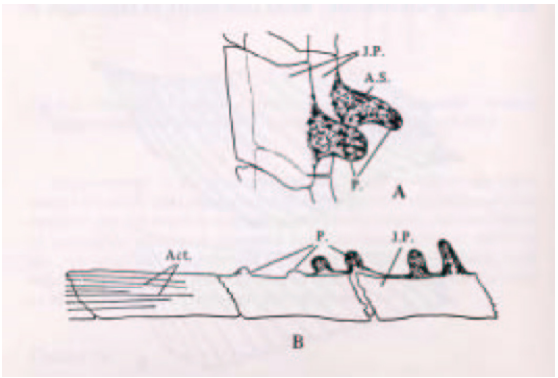


Fig.2.

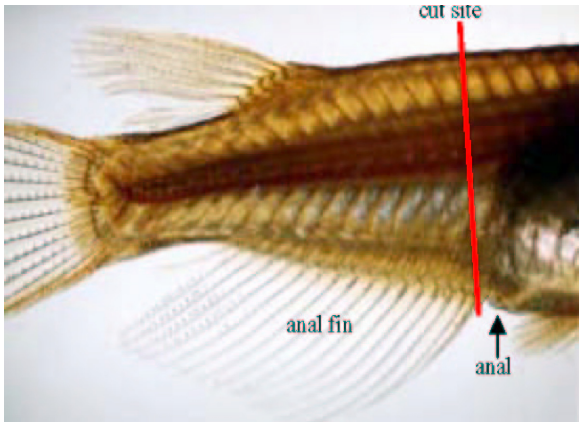
A, Tubercules papillaires situés sur les plaques conjointes de la nageoire anale. J.P., plaque conjointe; A.S., espace axial; P., tubercule B, Extrémité distale de la nageoire anale. Les actinotriches (Act.) sont situés à l'extrémité. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of Oryzias latipes and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



▼M6

Fig.3.

Photographie montrant le site de coupe lorsque la gonade est fixée dans une autre solution que du formol tamponné à 10 %. Dans ce cas, le corps restant sera coupé entre la région antérieure de la nageoire anale et l'anus à l'aide d'un rasoir (trait rouge). La tête sera placée dans la solution de fixation pour préserver la gonade, et la queue dans le formol tamponné à 10 %.



▼M6

Appendice 6

Procédures recommandées pour les prélèvements effectués à des fins de dosage de la vitellogénine

On prendra soin d'éviter la contamination croisée entre les échantillons de VTG des mâles et des femelles.

Procédure 1A: tête-de-boule, prélèvement sanguin dans l'artère / la veine caudale

Après anesthésie, le pédoncule caudal est partiellement sectionné avec une lame de scalpel, et un prélèvement sanguin est effectué dans l'artère/la veine caudale grâce à un tubule capillaire à microhématocrite héparinisé. Après le prélèvement sanguin, le plasma est rapidement séparé par centrifugation à température ambiante pendant 3 minutes à 15 000 *g* (ou bien à une température de 4 °C pendant 10 minutes à 15 000 g). Le pourcentage d'hématocrite peut éventuellement être déterminé à l'issue de la centrifugation. Le plasma est ensuite retiré du tube à microhématocrite puis stocké dans un tube de centrifugeuse avec 0,13 unité d'aprotinine (un inhibiteur de protéase) à – 80 °C jusqu'au dosage de la vitellogénine. Selon la taille du tête-de-boule (qui dépend du sexe), les volumes de plasma pouvant être prélevés sont généralement de 5 à 60 µl par individu (Jensen *et al.* 2001).

Procédure 1 B: tête-de-boule, prélèvement sanguin par ponction cardiaque

Il est également possible d'effectuer un prélèvement sanguin par ponction cardiaque effectuée à l'aide d'une seringue héparinisée (1 000 unités d'héparine par ml). Le sang est versé dans des tubes Eppendorf (maintenus dans de la glace) avant d'être centrifugé (5 minutes à 7 000 g à température ambiante). Le plasma est versé dans des tubes Eppendorf propres (dans des aliquotes si le volume de plasma le permet) puis rapidement congelé à – 80 °C jusqu'à l'analyse (Panter et al., 1998).

Procédure 2 A: Medaka japonais, excision du foie

Retrait des poissons d'essai de l'enceinte d'essai

(1) Les poissons d'essai sont sortis de l'enceinte d'essai à l'aide d'une épuisette. Attention à ne pas laisser tomber les poissons dans une autre enceinte d'essai.

(2) En principe, les poissons d'essai sont retirés dans l'ordre suivant: témoin, cuve témoin contenant le solvant (s'il y a lieu), concentration minimale, concentration moyenne, concentration maximale et témoin positif. De plus, tous les mâles sont retirés de l'enceinte d'essai avant les femelles.

(3) Le sexe de chaque poisson d'essai est identifié à partir des caractères sexuels secondaires externes (forme de la nageoire anale, par exemple).

(4) Placer les poissons dans un conteneur puis les transporter jusqu'au poste de travail pour l'excision du foie. Vérifier les étiquettes de l'enceinte d'essai et du conteneur de transport par souci de précision et pour confirmer que le nombre de poissons sortis de l'enceinte d'essai et le nombre de poissons restés dans l'enceinte d'essai sont compatibles avec les prévisions.

(5) Si le sexe ne peut pas être identifié d'après l'apparence externe du poisson, sortir tous les poissons de l'enceinte d'essai. Dans ce cas, le sexe est identifié par observation de la gonade ou des caractères sexuels secondaires au stéréomicroscope.

▼**M6**

Excision du foie

(1) Transférer les poissons d'essai du conteneur de transport vers la solution anesthésique avec l'épuisette.

(2) Après anesthésie, saisir les poissons d'essai avec des pincettes (de modèle courant) pour les déposer sur le papier filtre (ou essuie-tout). En saisissant les poissons, appliquer les pincettes sur les côtés de la tête pour éviter de casser la queue.

(3) Essuyer l'eau de la surface des poissons d'essai avec le papier filtre (ou essuie-tout).

(4) Placer les poissons sur le dos. Pratiquer ensuite une petite incision transversale entre la région ventre-nuque et le milieu de l'abdomen avec des ciseaux à dissection.

(5) Introduire les ciseaux à dissection dans la petite incision, et inciser l'abdomen le long de sa ligne médiane, depuis un point caudal par rapport au manteau branchial jusqu'au côté cranien de l'anus. Attention à ne pas introduire les ciseaux à disséquer trop profondément pour ne pas abîmer le foie et la gonade.

(6) Mener les opérations suivantes sous le stéréomicroscope.

(7) Placer les poissons sur le dos sur l'essuie-tout (ou une boîte de Pétri en verre ou une lame de verre).

(8) Écarter les parois de la cavité abdominale avec les pincettes de précision puis extérioriser les organes internes. Il est également possible d'extérioriser les organes internes en retirant l'une des parois de la cavité abdominale si nécessaire.

(9) Étaler la partie qui relie le foie et la vésicule biliaire à l'aide d'une autre paire de pincettes de précision. Saisir ensuite le canal biliaire et couper la vésicule biliaire. Veiller à ne pas rompre la vésicule biliaire.

(10) Saisir l'œsophage et exciser les intestins du foie selon la même méthode. Veiller à ce que le contenu du tube digestif ne s'échappe pas. Exciser l'intestin caudal de l'anus et retirer le tractus de la cavité abdominale.

(11) Retirer la masse de tissus graisseux et autres situés à la périphérie du foie. Prendre soin de ne pas abîmer le foie.

(12) Saisir la zone de la porte hépatique avec les pincettes de précision et retirer le foie de la cavité abdominale.

(13) Placer le foie sur la lame de verre. A l'aide des pincettes de précision, retirer les autres tissus graisseux et étrangers (paroi abdominale interne, par exemple), s'il y a lieu, de la surface du foie.

(14) Peser le foie au moyen d'une balance de précision électronique, en utilisant comme tare un microtube de 1,5 ml. Consigner la valeur sur la feuille de travail (précision à 0,1 mg près). Confirmer les informations d'identification sur l'étiquette du microtube.

(15) Fermer le capuchon du microtube contenant le foie. Stocker le microtube dans un bac de refroidissement (ou un bac de glace).

(16) Après chaque excision de foie, nettoyer les instruments de dissection ou les remplacer par des instruments propres.

▼**M6**

(17) Retirer le foie de tous les poissons se trouvant dans les conteneurs de transport comme indiqué ci-dessus.

(18) Après excision du foie de tous les poissons se trouvant dans le conteneur de transport (c'est- à-dire de tous les mâles et de toutes les femelles d'une enceinte d'essai), placer tous les spécimens hépatiques sur un support pour tubes munis d'une étiquette d'identification puis les stocker dans un congélateur. Lorsque les foies sont fournis pour pré-traitement peu de temps après leur excision, les spécimens sont transportés jusqu'au poste de travail le plus proche dans un bac de refroidissement (ou un bac de glace).

Après excision du foie, la carcasse est prête pour l'histologie gonadique et la mesure des caractères sexuels secondaires.

Spécimens

Stocker les spécimens hépatiques prélevés sur les poissons d'essai à une température ≤ – 70 °C s'ils ne sont pas utilisés pour le pré-traitement juste après leur excision.

Fig-1

Une incision est pratiquée avec des ciseaux juste avant les nageoires pectorales.

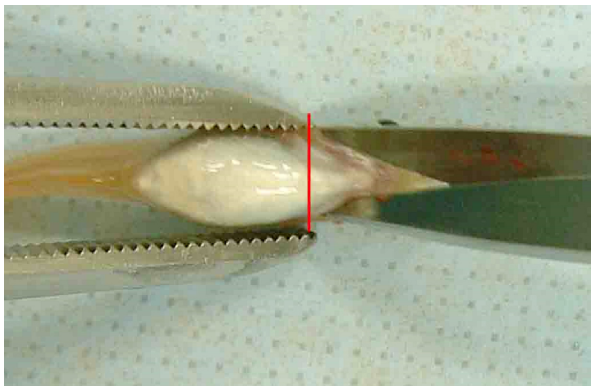
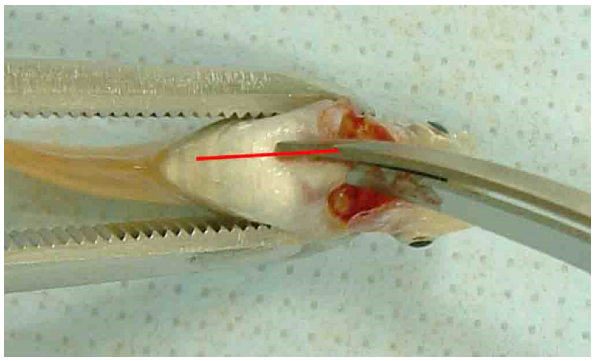


Fig-2

La ligne médiane de l'abdomen est incisée avec des ciseaux jusqu'à un point situé environ 2 mm au-dessus de l'anus.



▼M6

Fig-3

Les parois abdominales sont écartées avec des pincettes pour exposer le foie et les autres organes internes (elles peuvent aussi être épinglées latéralement).

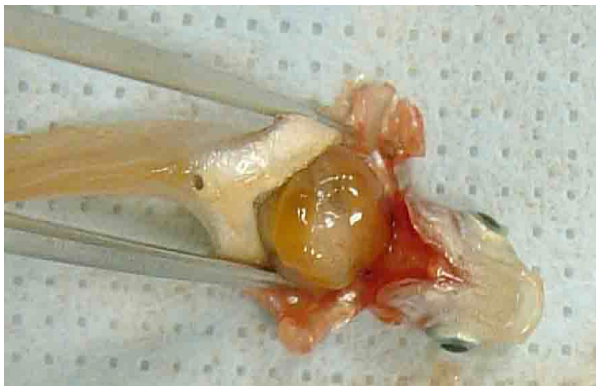


Fig-4

Le foie est disséqué et excisé avec des pincettes.

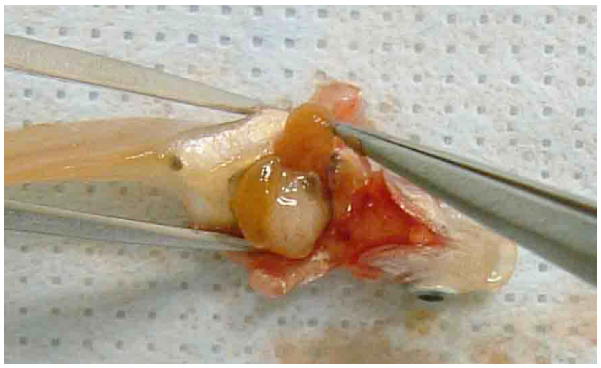


Fig-5

Les intestins sont délicatement retirés avec des pincettes.



▼M6

Fig-6

Les deux extrémités des intestins et les attaches du mésentère sont sectionnées avec des ciseaux.

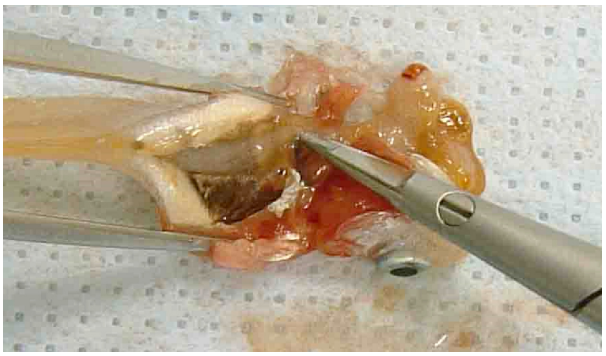


Fig-7 (femelle)

La procédure est identique pour les femelles.

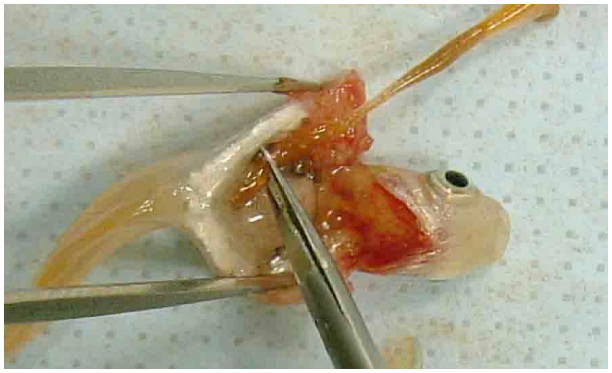
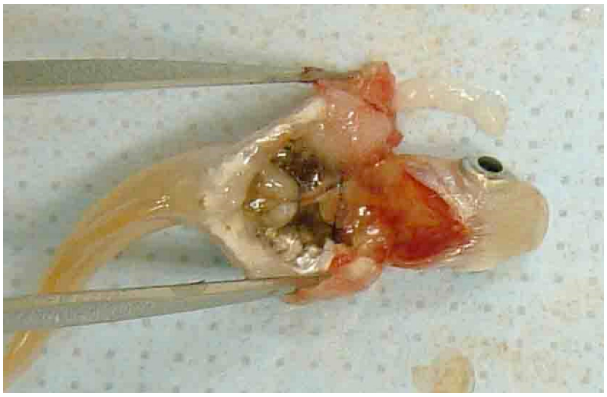


Fig-8

Procédure achevée.



Procédure 2 B: Medaka japonais (Oryzias latipes), pré-traitement du foie pour le dosage de la vitellogénine.

Retirer la bouteille contenant le tampon d'homogénat du kit ELISA et la refroidir avec de la glace pilée (température de la solution: ≤ 4 °C). Si un tampon d'homogénat provenant d'un kit ELISA EnBio est utilisé, laisser décongeler la solution à température ambiante, puis conserver la bouteille au frais avec de la glace pilée.

▼**M6**

Calculer le volume de tampon d'homogénat pour le foie à partir du poids de ce dernier (utiliser 50 µl de tampon d'homogénat par mg de foie pour l' homogénat). Exemple: Si le foie pèse 4,5 mg, le volume de tampon d'homogénat pour le foie sera de 225 µl. Dresser une liste des volumes de tampon d'homogénat pour tous les foies.

Préparation du foie pour le pré-traitement

(1) Retirer le microtube de 1,5 ml contenant le foie du congélateur juste avant le pré-traitement.

(2) Le pré-traitement du foie des mâles est effectué avant celui des femelles pour éviter toute contamination de la vitellogénine. De plus, le pré-traitement des groupes d'essai est effectué dans l'ordre suivant: témoin, cuve témoin contenant le solvant (s'il y a lieu), concentration minimale, concentration moyenne, concentration maximale et témoin positif.

(3) Le nombre de microtubes de 1,5 ml contenant les échantillons hépatiques sortis du congélateur à un moment donné ne dépasse pas le nombre de tubes pouvant être centrifugés à ce moment-là.

(4) Placer les microtubes de 1,5 ml contenant les échantillons hépatiques dans le bac de glace selon l'ordre de numérotation des spécimens (la décongélation du foie n'est pas utile).

Déroulement du pré-traitement

1. Ajout du tampon d'homogénéisation

(1) Vérifier sur la liste le volume de tampon d'homogénat à utiliser pour un échantillon hépatique particulier et ajuster la micropipette (gamme de volumes: 100-1 000 µl au volume approprié. Attacher un embout propre à la micropipette.

(2) Retirer le tampon d'homogénat du flacon de réactif et ajouter le tampon dans le microtube de 1,5 ml contenant le foie.

(3) Ajouter le tampon dans tous les microtubes de 1,5 ml contenant les échantillons hépatiques selon la procédure décrite ci-dessus. Il n'est pas nécessaire de remplacer l'embout de la micropipette par un embout neuf. Toutefois, si l'embout est contaminé ou suspect de contamination, il est changé.

2. Homogénéisation du foie

(1) Attacher un nouveau pilon d'homogénéisation à l'homogénéisateur du microtube.

(2) Introduire le pilon dans le microtube de 1,5 ml. Maintenir l'homogénéisateur pour presser le foie entre la surface du pilon et la paroi interne du microtube.

(3) Faire fonctionner l'homogénéisateur pendant 10 à 20 secondes. Conserver le microtube au frais avec de la glace pilée pendant l'opération.

(4) Retirer le pilon du microtube et laisser reposer pendant une dizaine de secondes. Procéder ensuite à une inspection visuelle de l'état de la suspension.

(5) Si des morceaux de foie sont observés dans la suspension, répéter les opérations (3) et (4) pour obtenir un homogénat de foie satisfaisant.

▼**M6**

(6) Conserver l'homogénat hépatique en suspension dans le bac de glace jusqu'à sa centrifugation.

(7) Utiliser un pilon neuf pour chaque homogénat.

(8) Homogénéiser tous les foies avec un tampon d'homogénat selon la procédure décrite ci-dessus.

3. Centrifugation de l'homogénat hépatique en suspension

(1) Confirmer que la température de la centrifugeuse réfrigérée est ≤ 5 °C.

(2) Introduire les microtubes de 1,5 ml contenant l'homogénat hépatique en suspension dans la centrifugeuse réfrigérée (rééquilibrer s'il y a lieu).

(3) Centrifuger l'homogénat hépatique en suspension pendant 10 minutes à 13 000 *g* à une température ≤ 5 °C. Toutefois, si les surnageants sont correctement séparés, la force centrifuge et la durée de centrifugation peuvent être ajustées s'il y a lieu.

(4) Après la centrifugation, vérifier que les surnageants sont correctement séparés (surface: lipides, intermédiaire: surnageant, culot: tissu hépatique). Si la séparation n'est pas concluante, renouveler la centrifugation de la suspension dans les mêmes conditions.

(5) Retirer tous les échantillons de la centrifugeuse réfrigérée et les placer dans le bac de glace selon l'ordre de numérotation des spécimens. Prendre soin de ne pas remettre en suspension les couches séparées après centrifugation.

4. Collecte du surnageant

(1) Placer quatre microtubes de 0,5 ml destinés au stockage du surnageant sur le support pour tubes.

(2) Recueillir 30 µl de chaque surnageant (formant la couche intermédiaire après séparation) à l'aide de la micropipette et les verser dans un microtube de 0,5 ml. Prendre soin de ne pas recueillir de lipides de la surface ou de tissu hépatique du culot.

(3) Recueillir le surnageant et le verser dans deux autres microtubes de 0,5 ml selon la procédure décrite ci-dessus.

(4) Recueillir le reste du surnageant à l'aide de la micropipette (si possible: ≥ 100 µl). Verser ensuite le surnageant dans le microtube de 0,5 ml restant. Prendre soin de ne pas recueillir de lipides de la surface ou de tissu hépatique du culot.

(5) Fermer le microtube de 0,5 ml avec le capuchon et inscrire le volume de surnageant sur l'étiquette. Placer immédiatement les microtubes dans le bac de glace.

(6) Remplacer l'embout de la micropipette par un embout neuf pour chaque surnageant. Si une grande quantité de lipides adhère à l'embout, remplacer immédiatement ce dernier par un embout neuf pour éviter la contamination de l'extrait hépatique avec la graisse.

(7) Verser tout le surnageant centrifugé dans quatre microtubes de 0,5 ml selon la procédure décrite ci-dessus.

▼M6

(8) Après avoir versé le surnageant dans les microtubes de 0,5 ml, placer tous ces derniers sur le support pour tubes avec leur étiquette d'identification, puis les mettre immédiatement au congélateur. Si les concentrations de VTG sont mesurées immédiatement après le pré-traitement, conserver au frais un microtube de 0,5 ml (contenant 30 µl de surnageant) dans le support pour tubes et le transférer jusqu'au poste de travail où l'essai ELISA est conduit. Dans ce cas, placer les microtubes restants dans les supports pour tubes et mettre le tout au congélateur.

(9) Après la collecte du surnageant, jeter le résidu comme il se doit.

Stockage des spécimens

Stocker les microtubes de 0,5 ml contenant le surnageant de l'homogénat hépatique à une température ≤ – 70 °C jusqu'à la conduite de l'essai ELISA.

Procédure 3 A: Poisson-zèbre, prélèvement sanguin dans l'artère/la veine caudale

Immédiatement après anesthésie, le pédoncule caudal est sectionné transversalement, et un prélèvement sanguin est effectué dans l'artère/la veine caudale grâce à un tubule capillaire à microhématocrite héparinisé. Les volumes sanguins collectés varient entre 5 et 15 µl selon la taille du poisson. Un volume identique de tampon d'aprotinine [6 µg/ml de solution tampon phosphate (PBS)] est ajouté dans le tube microcapillaire, et le plasma est séparé du sang par centrifugation (5 minutes à 600 g). Le plasma est versé dans des tubes à essais puis stocké à une température de – 20 °C jusqu'au dosage de la vitellogénine ou d'autres protéines produisant des effets intéressants.

Procédure 3 B: Poisson-zèbre, prélèvement sanguin par ponction cardiaque

Pour éviter la coagulation du sang et la dégradation de la protéine, les échantillons sont collectés sur une solution tampon phosphate (PBS) contenant de l'héparine (1 000 unités/ml) et de l'aprotinine, un inhibiteur de protéase (2 TIU/ml). Pour constituer le tampon, il est recommandé d'utiliser de l'héparine (sel d'ammonium) et de l'aprotinine lyophilisée. Pour le prélèvement sanguin, une seringue (1 ml) munie d'une fine aiguille fixe (Braun Omnikan-F, par exemple) est recommandée. La seringue est pré-remplie avec le tampon (approximativement 100 µl) afin d'éluer complètement les faibles volumes sanguins de chaque poisson. Les prélèvements sanguins sont effectués par ponction cardiaque. Tout d'abord, le poisson est anesthésié avec du MS-222 (100 mg/l). Le bon plan d'anesthésie est celui qui permet à l'utilisateur de distinguer le battement du cœur du poisson-zèbre. Pendant la ponction cardiaque, maintenir le piston de la seringue sous faible tension. Les volumes sanguins pouvant être collectés varient entre 20 et 40 microlitres. Après la ponction cardiaque, le mélange sang/tampon est placé dans le tube à essais. Le plasma est séparé du sang par centrifugation (20 minutes à 5 000 g) et est stocké à une température de – 80 °C jusqu'à l'analyse.

Procédure 3C: POS: Poisson-zèbre, homogénéisation de la tête et de la queue

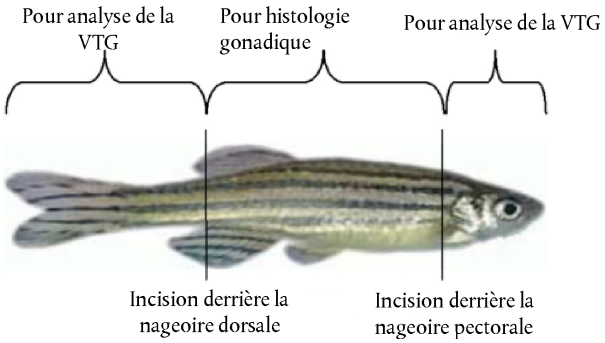
(1) Les poissons sont anesthésiés puis euthanasiés conformément à la description de l'essai.

(2) La tête et la queue du poisson sont coupées comme indiqué sur la figure 1.

Note importante: Tous les instruments de dissection ainsi que la planche à découper sont rincés et lavés correctement (avec de l'éthanol à 96 %, par exemple) entre chaque manipulation de poisson pour éviter que la vitellogénine des femelles ou des mâles induits ne «pollue» les mâles non-induits.

▼**M6**

Figure 1



(3) L'ensemble tête-queue de chaque poisson est pesé au mg près.

(4) Après avoir été pesés, les morceaux sont placés dans des tubes appropriés (Eppendorf de 1,5 ml, par exemple) et stockés à une température de – 80 °C jusqu'à leur homogénéisation ou bien directement homogénéisées sur de la glace avec deux pilons en plastique. (D'autres méthodes peuvent être utilisées si elles impliquent de la glace et permettent d'obtenir une masse homogène). Note importante: Les tubes sont numérotés correctement de façon que la tête et la queue du poisson puissent être reliées à la partie du corps correspondante utilisée pour l'histologie gonadique.

(5) Après obtention d'une masse homogène, on ajoute un tampon d'homogénéisation (*) glacé représentant 4 × la masse pondérale tissulaire. Continuer à pilonner jusqu'à ce que le mélange soit homogène. Note importante: De nouveaux pilons sont utilisés pour chaque poisson.

(6) Les échantillons sont placés sur de la glace jusqu'à centrifugation à 50 000 g pendant 30 min. et à une température de 4 °C.

(7) Utiliser une pipette pour répartir des portions de 20 µl de surnageant dans au moins deux tubes en plongeant l'embout de la pipette sous la couche lipidique située à la surface et en aspirant doucement le surnageant sans fraction lipidique ni culot.

(8) Les tubes sont stockés à une température de – 80 °C jusqu'à leur utilisation.

(*) **Tampon d'homogénéisation:**

— [50 mM de Tris-HCl de pH 7,4; 1 % de cocktail d'inhibiteurs de protéase (Sigma)]: 12 ml de Tris-HCl de pH 7,4 + 120 µl de cocktail d'inhibiteurs de protéase.

— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) de chez Bie & Berntsen (Danemark), par exemple.

— Cocktail d'inhibiteurs de protéase: de chez Sigma (pour les tissus mammaliens). Numéro de produit P 8340.

— *Note:* Le tampon d'homogénéisation est utilisé le jour de sa fabrication. Placer sur de la glace pendant l'utilisation.

▼**M6**

Appendice 7

Échantillons fortifiés de vitellogénine utilisant un étalon de référence inter-essais

Chaque jour où des essais d'induction de la vitellogénine sont effectués, un échantillon fortifié préparé à l'aide d'un étalon de référence inter-essais sera analysé. La vitellogénine utilisée pour préparer l'étalon de référence inter-essais sera issue d'un lot différent de celui utilisé pour préparer les solutions-étalons pour l'essai en cours.

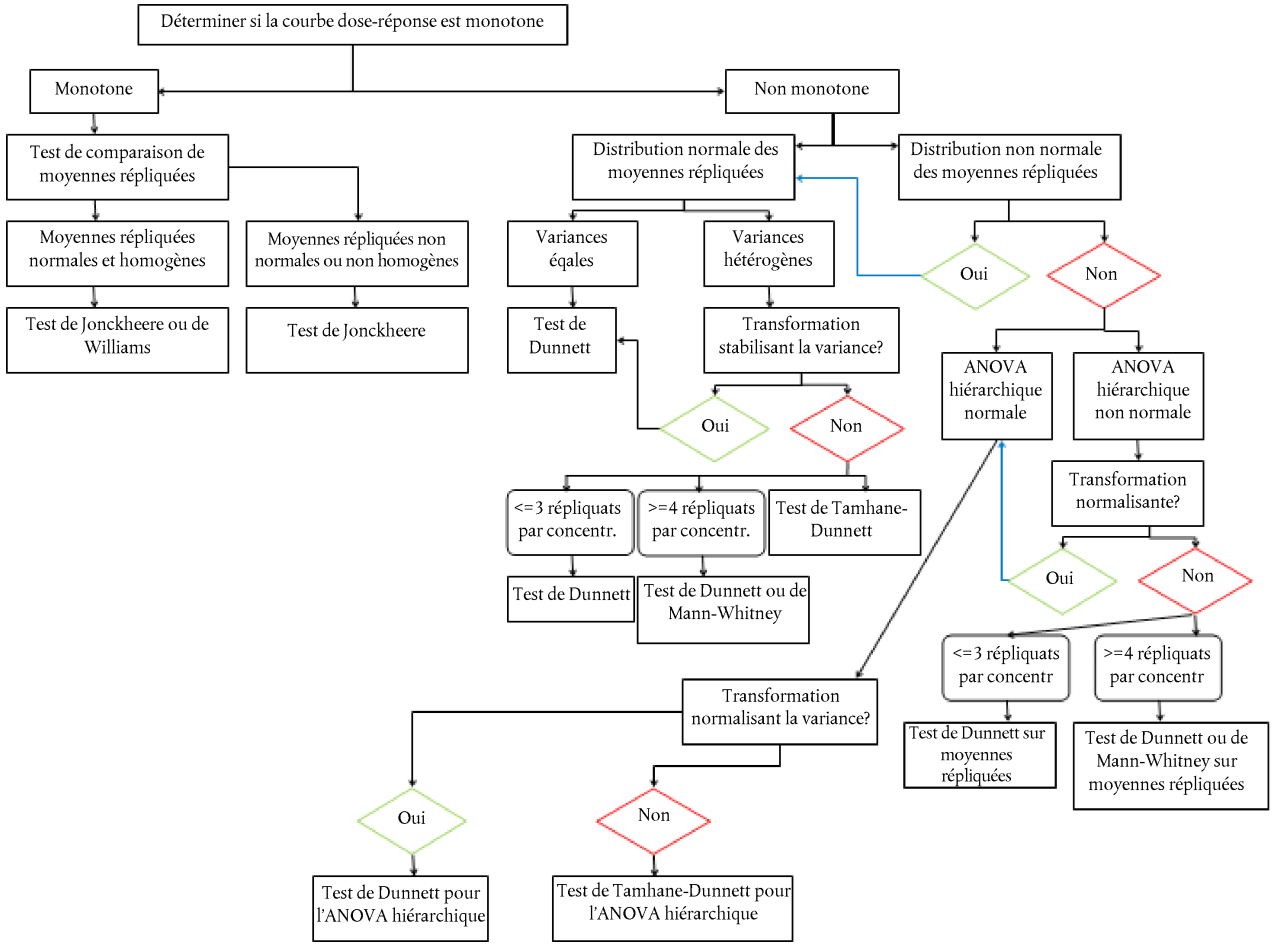
Pour préparer l'échantillon fortifié, on ajoutera une quantité connue d'étalon inter-essais à un échantillon de plasma de mâle témoin. L'échantillon sera fortifié jusqu'à atteindre une concentration de vitellogénine de 10 à 100 fois supérieure à la concentration de vitellogénine attendue chez les mâles témoins. L'échantillon de plasma ainsi fortifié peut provenir d'un seul poisson ou de plusieurs poissons.

Un sous-échantillon du plasma de mâle témoin non fortifié sera analysé dans au moins deux puits dupliqués. L'échantillon fortifié sera aussi analysé dans au moins deux puits dupliqués. La quantité moyenne de vitellogénine dans les deux échantillons non fortifiés de plasma de mâle témoin sera ajoutée à la quantité calculée de vitellogénine ajoutée pour fortifier les échantillons afin de déterminer la concentration attendue. On notera alors systématiquement le rapport entre cette concentration attendue et la concentration mesurée, ainsi que les résultats de chaque série d'essais effectués ce jour-là.

▼M6

Appendice 8

Ordinogramme d'analyse statistique



02008R0440 — FR — 16.10.2019 — 008.001 — 2200

▼M6

C.38. ESSAI DE MÉTAMORPHOSE DES AMPHIBIENS

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 231(2009) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Le développement et la validation d'un essai, capable de déceler les substances chimiques actives sur le système thyroïdien chez les vertébrés, sont devenus nécessaires du fait des inquiétudes relatives à la présence dans l'environnement de produits chimiques dans des teneurs susceptibles de provoquer des effets néfastes sur les humains et la faune. En 1998, l'OCDE a lancé une activité à caractère hautement prioritaire visant à réviser les lignes directrices existantes ou à établir de nouvelles lignes directrices pour le dépistage et les tests des substances susceptibles d'avoir des effets perturbateurs sur le système endocrinien. Un des axes de cette activité consistait à développer une ligne directrice pour le dépistage des substances chimiques actives sur le système thyroïdien chez les vertébrés. Une version étendue du document intitulé Toxicité orale à doses répétées pendant 28 jours sur les rongeurs (Chapitre B.7 de la présente annexe) et un essai de métamorphose des amphibiens (EMA) ont été proposés. La méthode d'essai B.7 ainsi amendée a été soumise à validation, avant d'être publiée dans une nouvelle mouture révisée. L'essai de métamorphose des amphibiens (EMA) a suivi un programme de validation complet, comprenant des études intralaboratoires et interlaboratoires visant à en démontrer la pertinence et la fiabilité (1, 2). La validation de l'essai a ensuite fait l'objet d'un examen par les pairs, constitués d'un jury d'experts indépendants (3). La présente méthode d'essai est donc le fruit de l'expérience acquise au cours des études de validation concernant la détection de substances chimiques actives sur la thyroïde, ainsi que des travaux menés par ailleurs au sein des pays membres de l'OCDE.

PRINCIPE DE L'ESSAI

2. L'essai de métamorphose des amphibiens (EMA) est un essai de dépistage visant à identifier de manière empirique les substances chimiques susceptibles de perturber le fonctionnement normal de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien (HHT). L'EMA constitue un modèle généralisé pour les vertébrés, dans la mesure où il se fonde sur des fonctions et des structures conservées de l'axe HHT. Cet essai est important, car la métamorphose des amphibiens est un processus bien étudié, dépendant de la thyroïde, et répondant aux substances chimiques actives sur l'axe HHT. De plus, il s'agit du seul essai existant capable de détecter l'activité sur la thyroïde chez un animal en cours de développement morphologique.

3. Le schéma expérimental général comprend l'exposition de têtards de *Xenopus laevis* au stade 51 à un minimum de trois concentrations différentes d'une substance chimique d'essai ainsi qu'à un témoin d'eau pure pendant 21 jours. Chaque traitement d'essai est effectué avec quatre répliquats. La densité des larves au lancement de l'essai s'élève à 20 têtards par vivier ou répliquat pour l'ensemble des groupes traités. Les observations rapportées sont la longueur des pattes postérieures, la longueur museau-cloaque (LMC), le stade de développement, le poids humide, l'histologie de la thyroïde et la mortalité quotidienne. © OCDE, (2009). L'OCDE autorise l'utilisation de ce contenu pour usage personnel, dans un but non commercial sans autorisation préalable, sous réserve de mention de la source. Toute utilisation à but commercial doit faire l'objet d'une autorisation écrite préalable de l'OCDE.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Espèces utilisées dans l'essai

4. *Xenopus laevis* est une espèce élevée couramment dans les laboratoires du monde entier, et aisément accessible auprès de fournisseurs commerciaux. Sa reproduction peut être induite facilement tout au long de l'année au moyen d'injections de gonadotropine chorionique humaine (hCG), les larves ainsi obtenues peuvent être élevées en grand nombre de manière systématique jusqu'aux stades de développement voulus, afin d'appliquer

▼M6

des protocoles d'essai spécifiques au stade de développement. Dans le cadre du présent essai, il est préférable d'utiliser des larves issues d'adultes élevés in situ. Bien qu'il ne s'agisse pas de la procédure privilégiée, il est également possible de transférer les œufs et les embryons à partir d'un autre laboratoire menant cet essai, et de leur permettre de s'acclimater. En revanche, l'expédition d'animaux au stade larvaire destinés à l'essai n'est pas acceptable.

Équipement et fournitures

5. Le matériel suivant est nécessaire à la conduite de l'essai:

a) système d'exposition (voir la description ci-dessous);

b) aquariums en verre ou en acier inoxydable (voir la description ci-dessous);

c) viviers de reproduction;

d) appareil de contrôle de la température (p. ex., dispositifs de chauffage et de refroidissement réglables à 22 ± 1 °C);

e) thermomètre;

f) microscope binoculaire à dissection;

g) caméra numérique dotée d'une résolution minimale de 4 mégapixels et d'une fonction micro;

h) logiciel de numérisation des images;

i) boîtes de Petri (p. ex. 100 × 15 mm) ou chambre de plastique transparent de taille comparable;

j) balance analytique d'une précision de 3 décimales (mg);

k) appareil de mesure de l'oxygène dissous;

l) pH-mètre;

m) appareil de mesure de l'intensité lumineuse capable de fournir des résultats en lux;

n) divers outils et éléments de verrerie de laboratoire;

o) pipettes réglables (10 à 5 000 µl) ou série de pipettes de tailles équivalentes;

p) quantités suffisantes de substance chimique d'essai pour mener l'étude, de préférence issues du même numéro de lot;

q) instruments d'analyse adaptés à la substance d'essai, ou recours à des services d'analyse contractuels.

Testabilité des substances chimiques

6. L'EMA est fondé sur un protocole d'exposition en milieu aquatique selon lequel la substance d'essai est introduite dans le récipient d'essai par le biais d'un système d'écoulement continu. Les méthodes par écoulement continu sont néanmoins soumises aux contraintes relatives au type de substances chimiques pouvant être soumises à l'essai, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Par conséquent, avant la mise en œuvre de ce protocole, il convient de collecter les informations de référence sur la substance chimique en question pour déterminer sa testabilité, et de consulter la publication intitulée OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (4). Parmi les caractéristiques indiquant d'éventuelles difficultés pour un test

▼M6

en milieu aquatique figurent: des coefficients de partition eau/octanol (log K_{oe}) élevés, une volatilité importante, une tendance à l'hydrolyse et à la photolyse dans les conditions d'éclairage ambiant d'un laboratoire. D'autres facteurs peuvent entrer en jeu dans la détermination de la testabilité, et font l'objet d'une évaluation au cas par cas. Si l'utilisation d'un système d'écoulement continu ne permet pas de tester la substance, il est possible de recourir à un dispositif de renouvellement statique. Dans le cas où aucune des solutions n'est adaptée à la substance d'essai, celle-ci ne peut donc pas être soumise au présent protocole.

Système d'exposition

7. Un système de dilution par écoulement continu est préférable, si possible, à un dispositif de renouvellement statique. Si les propriétés physiques et/ou chimiques de l'une des substances chimiques d'essai ne permettent pas de recourir à un système de dilution par écoulement continu, un procédé d'exposition différent (p. ex. avec renouvellement statique) peut être employé. Les composants du système sont constitués d'un matériau adapté au contact avec l'eau, comme le verre, l'acier inoxydable ou le polytétrafluoroéthylène. Certaines matières plastiques appropriées peuvent toutefois être utilisées à condition qu'elles ne perturbent par l'étude. Les viviers d'exposition sont constitués d'aquariums de verre ou d'acier inoxydable, équipés de conduites verticales maintenant le volume d'eau entre 4,0 et 10,0 l et une profondeur minimum du milieu de 10 à 15 cm. Le système prend en charge l'ensemble des concentrations d'exposition ainsi que le témoin, avec quatre répliquats par traitement. La vitesse d'écoulement de chaque vivier est constante afin de garantir la stabilité des conditions biologiques et de l'exposition chimique (par exemple 25 ml/min). Les viviers sont disposés de manière aléatoire au sein du système d'exposition, pour amoindrir les effets éventuellement liés à la position, comprenant notamment de légères variations de température, d'intensité lumineuse, etc. Un éclairage fluorescent est apporté selon un cycle de 12 h de lumière/12 h d'obscurité, avec une intensité à la surface de l'eau comprise entre 600 et 2 000 lux (lumens/m^2). Dans chaque vivier d'essai, les conditions sont maintenues aux valeurs suivantes: température de l'eau à 22 ± 1 °C, pH entre 6,5 et 8,5, et concentration d'oxygène dissous (OD) supérieure à 3,5 mg/l (> 40 % de la saturation de l'air). Ces valeurs sont contrôlées au minimum une fois par semaine, la température étant de préférence mesurée en permanence dans au moins un des récipients d'essai. L'Appendice 1 présente les conditions expérimentales nécessaires à l'exécution de ce protocole. Pour des informations complémentaires concernant la mise en place de systèmes d'exposition à écoulement continu et/ou renouvellement statique, veuillez vous reportez au guide de l'ASTM intitulé Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians (5) et aux essais de toxicologie aquatique généraux.

Qualité de l'eau

8. Toute eau disponible localement (par exemple: eau de source ou eau du robinet filtrée sur charbon) et permettant la croissance et le développement normaux des têtards de *X. laevis* peut être employée. Dans la mesure où la qualité de l'eau est susceptible de varier de façon importante d'une zone à l'autre, elle est évaluée, en particulier en l'absence de données historiques concernant l'usage de cette eau pour élever des *xénopes*. Il convient de vérifier avec soin que l'eau ne contient pas de cuivre, de chlore ou de chloramines, tous ces produits chimiques étant toxiques pour les grenouilles et les têtards. Il est également recommandé d'analyser les concentrations de fluorure, perchlorate et chlorate (produits secondaires issus de la désinfection de l'eau potable) dans le milieu aquatique, puisque tous ces anions sont des substrats des transporteurs d'iode de la

▼M6

glande thyroïde, et que des teneurs élevées de chacun de ces ions sont susceptibles de perturber les résultats de l'essai. L'analyse est réalisée avant le lancement des essais, et l'eau utilisée dans ce cadre ne contient donc normalement pas ces anions.

Concentration d'iode dans l'eau employée pour l'essai

9. La synthèse d'hormones par la glande thyroïde repose sur des apports suffisants d'iode aux larves, assurés par une combinaison de sources aqueuses et alimentaires. Il n'existe aujourd'hui aucune recommendation d'origine empirique concernant les concentrations d'iode minimales. Cependant, la disponibilité de l'iode est susceptible d'affecter la capacité de réponse du système thyroïdien aux agents actifs sur la thyroïde, un facteur par ailleurs connu pour influencer l'activité basale de cette glande: ce point mérite d'être pris en compte lors de l'interprétation des résultats d'histopathologie de la thyroïde. C'est pourquoi les concentrations d'iode mesurées dans le milieu aquatique utilisé pour l'essai sont rapportées. D'après les données accessibles des études de validation, les concentrations de l'iodure (I^-) dans l'eau de l'essai étaient situées entre 0,5 et 10 µg/l. Dans l'idéal, cette concentration ne devrait pas chuter en dessous de 0,5 µg/L. Lorsque l'essai est mené avec de l'eau désionisée, un supplément d'iode est nécessaire afin d'atteindre cette concentration minimum de 0,5 µg/l. Tout nouvel ajout d'iode ou d'autres sels à l'eau de l'essai est notifié dans le rapport.

Maintenance des animaux

Soin et reproduction des adultes

10. Le soin et la reproduction des adultes sont réalisés conformément aux guides standard. Pour des informations plus détaillées, et le lecteur est invité à se reporter au guide des normes en matière d'essai de tératogénèse sur embryons de grenouille (FETAX) (6). Ces guides standard présentent un exemple des méthodes de soin et de reproduction adaptées, sans qu'il ne soit nécessaire de s'y conformer strictement. Pour provoquer la reproduction, des couples (3 à 5) d'adultes mâles et femelles reçoivent une injection de gonadotropine chorionique humaine (hCG). La dose injectée aux femelles et aux mâles s'élève respectivement à environ 800 UI - 1 000 UI et 600 UI — 800 UI de hCG dissoute dans une solution saline à 0,6 - 0,9 %. Les couples de reproducteurs sont placés dans de grands viviers, à l'abri des perturbations et dans des conditions statiques, en vue de stimuler l'amplexus. Chaque vivier de reproduction est équipé d'une grille en plastique ou en acier inoxydable en guise de faux plancher, permettant aux amas d'œufs de tomber dans un double fond. Si les grenouilles reçoivent une injection en fin d'après-midi, elles déposent habituellement la majorité de leurs œufs vers le milieu de la matinée suivante. Lorsqu'une quantité suffisante d'œufs ont été libérés et fertilisés, il convient de retirer les adultes des viviers de reproduction.

Soin et sélection des larves

11. Une fois que les adultes ont quitté les viviers de reproduction, les œufs sont collectés et évalués en termes de viabilité en se fondant sur un sous-échantillon d'embryons représentatifs issus de tous ces viviers. Le ou les meilleurs frais produits par un individu (2 à 3 sont recommandés pour évaluer la qualité des frais) sont retenus, d'après des critères liés à la viabilité et à la quantité des embryons (s'élevant à 1 500 minimum). Tous les organismes employés dans l'étude sont issus d'un même frai, ce qui implique que les frais ne soient pas mélangés les uns aux autres. Les embryons sont transférés dans une boîte ou un récipient plat, et tous les œufs manifestement morts ou anormaux [voir la définition en (5)] sont retirés à l'aide d'une pipette. Les embryons sains de chacun des trois frais sont alors placés dans trois viviers différents d'éclosion. Quatre jours après

▼**M6**

ce transfert, le meilleur frai est sélectionné, sur des critères de viabilité et de succès de l'éclosion, et les larves sont réparties dans un nombre approprié de viviers d'élevage à 22 ± 1 °C. En outre, d'autres larves sont hébergées dans des viviers supplémentaires pour servir de doublure dans l'hypothèse où une mortalité serait observée dans les viviers d'élevage pendant la première semaine. Cette procédure maintient une densité d'individus cohérente, ce qui limite les divergences de développement au sein d'une cohorte issue d'un même frai. L'ensemble des viviers d'élevage sont vidés quotidiennement. Par précaution, les gants vinyle ou nitrile sont préférés aux gants en latex. Les individus décédés sont retirés tous les jours et remplacés par les larves prévues à cet effet afin de maintenir une densité d'organismes constante pendant la première semaine. Les larves sont alimentées au moins deux fois pas jour.

12. Pendant la phase de pré-exposition, les têtards sont acclimatés aux conditions correspondant à la phase d'exposition réelle, y compris le type de nourriture, la température, le cycle lumière/obscurité et le milieu d'élevage. Il est donc recommandé d'employer la même eau pour la dilution/l'élevage au cours des phases de pré-exposition puis d'exposition. Lorsqu'un système d'élevage statique est utilisé lors de la préexposition des têtards, le milieu est intégralement renouvelé au moins deux fois par semaine. Il convient d'éviter le surpeuplement, dû à des densités de larves importantes pendant la période de pré-exposition, car ces conditions sont susceptibles de fortement perturber le développement des têtards lors de la phase d'essai consécutive. Aussi la densité ne doit-elle pas dépasser environ quatre têtards par litre de milieu d'élevage (dans le cas d'un système d'exposition statique) ou dix têtards par litre de milieu d'élevage (avec p. ex. une vitesse d'écoulement de 50 ml/min dans le système d'élevage ou de pré-exposition). Dans ces conditions, les têtards se développent pour passer du stade 45/46 au stade 51 en douze jours. Le stade de développement des têtards représentatifs de la population de cette lignée est évalué quotidiennement afin de déterminer le bon moment pour entamer la phase d'exposition. Il convient d'être attentif à stresser et perturber les têtards le moins possible, en particulier pendant les déplacements, le nettoyage des aquariums et la manipulation des larves. De même, toute activité ou condition stressante est évitée, notamment les bruits forts et/ou constants, les vibrations et coups au niveau des aquariums, l'activité excessive en laboratoire et les changements brusques de l'environnement (exposition lumineuse, température, pH, OD, vitesse d'écoulement, etc.). Si les têtards ne se développent pas jusqu'au stade 51 dans les 17 jours qui suivent la fertilisation, l'excès de stress est considéré comme une des causes éventuelles de ce retard.

Alimentation et élevage des larves

13. Les têtards sont nourris avec, par exemple, l'aliment pour têtards du commerce qui est utilisé dans les études de validation (voir également l'Appendice 1) pendant la période de pré-exposition [après le stade Nieuwkoop Faber (NF) 45/46 (8)] et durant toute la phase d'essai de 21 jours, ou tout autre régime alimentaire ayant fait preuve des mêmes performances dans le cadre d'un essai de métamorphose des amphibiens. Pendant la période de préexposition, le régime alimentaire est soigneusement ajusté aux demandes des têtards en développement. En pratique, de petites portions de nourriture sont apportées aux larves nouvellement écloses plusieurs fois par jour (au moins deux fois). Néanmoins, l'excès de nourriture est à éviter *i)* pour maintenir la qualité de l'eau et *ii)* pour prévenir l'encrassement des filtres des branchies avec des particules alimentaires et des détritus. En cas d'emploi de l'aliment pour têtards utilisé dans les études de validation, les rations quotidiennes sont augmentées au cours de la croissance des têtards jusqu'à atteindre environ 30 mg/animal/jour, peu avant le début de l'essai. Cet aliment pour têtards disponible dans le

▼M6

commerce, dont les études de validation ont révélé l'aptitude à permettre une croissance et un développement corrects des larves de *X. laevis* se compose de fines particules qui restent en suspension dans la colonne d'eau pendant une longue période, et peuvent être entraînées par l'écoulement. La dose quotidienne de nourriture est donc répartie en portions réduites, apportées au moins deux fois par jour. Dans le cas de cet aliment, le régime alimentaire est présenté dans le Tableau 1. Le rythme d'alimentation est enregistré. L'aliment peut être administré sous forme sèche ou mis en réserve en solution dans l'eau de dilution. Une telle solution de réserve est préparée de nouveau un jour sur deux, et conservée à 4 °C quand elle n'est pas utilisée.

Tableau 1.

Régime alimentaire des têtards de *X. laevis* pendant la phase de l'EMA où les animaux sont en vie, en condition d'écoulement continu

Jour d'étude	Ration alimentaire (mg d'aliment/animal/jour)
0 - 4	30
5 - 7	40
8 - 10	50
11 - 14	70
15 - 21	80

Analyse chimique

14. Avant de lancer l'étude, il convient d'évaluer la stabilité de la substance chimique d'essai en se penchant sur les informations disponibles en termes de solubilité, de dégradabilité et de volatilité. Des échantillons des solutions d'essai de chaque vivier répliqué pour chacune des concentrations sont soumis à des analyses chimiques au début de l'essai (jour 0), et une fois par semaine pendant son déroulement pour un minimum de quatre échantillons. Il est également conseillé d'analyser chaque concentration d'essai lors de la préparation du système afin d'en vérifier les performances, avant de lancer l'essai. L'analyse des solutions de réserve est en outre recommandée à chaque fois qu'elles sont renouvelées, en particulier si leur volume ne correspond pas aux quantités de produits chimiques suffisantes pour couvrir l'ensemble de la période d'échantillonnage de routine. Si les substances chimiques se révèlent indétectables à certaines, voire toutes les concentrations prévues pour l'essai, les solutions de réserve sont analysées et les vitesses d'écoulement du système sont enregistrées en vue de calculer les concentrations nominales.

Introduction des substances chimiques

15. La méthode employée pour introduire la substance chimique d'essai dans le système est variable en fonction des propriétés physico-chimiques de la substance chimique. Les substances hydrosolubles peuvent être mises en solution en aliquotes dans l'eau utilisée pour l'essai à des concentrations aboutissant à la teneur voulue dans le cadre d'une introduction au moyen d'un système d'écoulement continu. Les substances chimiques liquides à température ambiante mais peu solubles dans l'eau peuvent être introduites avec les méthodes de saturation liquide-liquide. Les substances chimiques solides à température ambiante et faiblement hydrosolubles peuvent être introduites par saturation avec colonne de laine de verre (7). Les systèmes dépourvus de véhicules sont préférables, cependant les différentes substances d'essai possèdent des propriétés physico-chimiques variables, qui réclament des approches diverses pour la préparation des solutions aqueuses visant à l'exposition chimique. La priorité demeure néanmoins de chercher à éviter les solvants et autres véhicules, car: *i)* certains

▼M6

solvants sont par eux-mêmes susceptibles de se révéler toxiques et/ou d'induire des réponses endocriniennes indésirables ou inattendues, *ii)* l'essai de substances chimiques à une concentration supérieure à leur solubilité dans l'eau (ce qui arrive fréquemment si des solvants sont utilisés) peut fausser la détermination des concentrations efficaces, et *iii)* le recours aux solvants dans les essais à long terme peut se traduire par la formation importante de biofilms associés à l'activité microbienne. En présence de substances d'essai difficiles à tester, le solvant n'est utilisé qu'en dernier ressort, et le document intitulé OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures (4) est consulté afin de déterminer la meilleure méthode à employer. Le choix du solvant est guidé par les propriétés chimiques de la substance concernée. Parmi les solvants qui se sont révélés efficaces pour les essais de toxicité aquatique figurent l'acétone, l'éthanol, le méthanol, le diméthylformamide et le triéthylène glycol. Si un solvant est employé comme véhicule, ses concentrations demeurent en dessous de la concentration sans effet observé chronique; le document d'orientation de l'OCDE préconise un maximum de 100 µl/l, cependant un rapport récent ramène cette recommandation à une concentration de solvant dans l'eau de dilution limitée à 20 µl/l seulement (12). De plus, en cas de recours à un solvant comme véhicule, des témoins appropriés pour le solvant sont analysés en plus des témoins sans solvant (eau pure). Lorsque l'introduction du produit chimique se révèle impossible via l'eau, que ce soit en raison de ses caractéristiques physico-chimiques (faible solubilité) ou de sa disponibilité limitée, l'administration par le biais de l'alimentation peut être envisagée. Quelques travaux préliminaires ont été menés pour ce qui relève de l'exposition par la nourriture, cependant cette méthode demeure marginale. Le choix du procédé s'appuie sur une documentation solide et fait l'objet de vérification par l'analyse.

Sélection des concentrations d'essai

Établissement de la concentration d'essai maximale

16. Dans le cadre de l'essai, la concentration maximale correspond: soit à la limite de solubilité de la substance en question: soit à la concentration maximale tolérée (CMT) pour les substances chimiques présentant une toxicité aiguë, soit à 100 mg/l, la concentration résultante la plus basse étant retenue.

17. La CMT est définie comme la concentration de la substance d'essai la plus élevée entraînant moins de 10 % de mortalité aiguë. Pour recourir à cette approche, des données empiriques relatives à la mortalité aiguë permettant d'estimer la valeur de la CMT sont nécessaires. La détermination de la CMT peut s'avérer inexacte, et requiert donc généralement un avis professionnel. Si les modèles de régression constituent les outils les plus solides techniquement pour estimer la CMT, il est néanmoins possible d'en obtenir une approximation utile en divisant par trois les données existantes de toxicité aiguë exprimée par la CL_{50}. Les données de toxicité aiguë peuvent cependant manquer pour les espèces employées dans l'essai. Si ces valeurs ne sont pas disponibles pour ces espèces, un essai de CL_{50} peut être effectué sur 96 h avec des têtards représentatifs (c'est-à-dire au même stade de développement) de la population soumise à l'EMA. Il est également possible, lorsque des données sur d'autres espèces aquatiques sont disponibles (par exemple des études de CL_{50} chez les poissons ou chez d'autres amphibiens), de faire appel à l'avis d'un professionnel qui fournira une estimation de la CMT probable, au moyen d'une extrapolation interespèces.

18. Si la substance chimique ne présente pas de toxicité aiguë et demeure soluble à plus de 100 mg/l, une autre solution consiste à choisir cette valeur comme concentration d'essai maximale (CEM), puisque cette dernière est habituellement considérée comme «pratiquement non toxique».

▼**M6**

19. Par ailleurs, et bien qu'il ne s'agisse pas de la procédure recommandée, des méthodes de renouvellement statique peuvent être mises en œuvre quand les méthodes par écoulement continu ne permettent pas d'atteindre la CMT. Si ces méthodes de renouvellement statiques sont employées, la stabilité de la concentration de la substance chimique d'essai est alors consignée, et reste dans les limites des critères de performances de l'essai. Des périodes de renouvellement de 24 h sont conseillées. En revanche, les périodes de renouvellement dépassant les 72 h ne sont pas acceptables. Les autres paramètres caractérisant la qualité de l'eau (notamment OD, température, pH, etc.) sont en outre mesurés à l'issue de chaque période, juste avant le renouvellement.

Fourchette de concentrations de l'essai

20. Le minimum requis comprend trois concentrations d'essai et un témoin d'eau pure (plus un véhicule témoin, le cas échéant). Le différentiel entre la plus élevée et la plus basse des concentrations d'essai minimale observées est d'environ une unité d'ordre de grandeur. La distance entre deux doses correspond au maximum à un facteur de 0,1 et au minimum de 0,33.

PROCÉDURE

Lancement et conduite de l'essai

Jour 0

21. L'exposition débute lorsqu'un nombre suffisant de têtards de la population d'élevage en préexposition ont atteint le stade de développement 51, d'après Nieuwkoop et Faber (8), et que leur âge postfertilisation est inférieur ou égal à 17 jours. Pour sélectionner les individus destinés à l'essai, les têtards d'aspect sain et normal sont isolés du reste de la lignée et placés dans un même récipient contenant un volume adapté d'eau de dilution. La détermination du stade de développement est effectuée en retirant un à un les têtards du vivier commun à l'aide d'un petit filet ou d'une passoire pour les transférer dans une chambre de mesure transparente (p. ex. une boîte de Petri de 100 mm) remplie d'eau de dilution. S'il est préférable de ne pas recourir à l'anesthésie pendant la détermination du stade de développement, on peut toutefois anesthésier les têtards individuellement avant manipulation avec 100 mg/l de méthanesulfonate de tricaïne (p. ex. MS-222), convenablement tamponné au bicarbonate de sodium (pH 7,0). Si le choix de l'anesthésie est retenu, il convient de recueillir la méthodologie appropriée pour utiliser le MS-222, par exemple, auprès de laboratoires expérimentés, et de la rapporter avec les résultats de l'essai. Les animaux sont traités avec soin durant le transfert afin de minimiser le stress dû à la manipulation et d'éviter toute blessure.

22. Le stade de développement des individus est évalué au moyen d'un microscope binoculaire à dissection. Pour réduire la variabilité maximale du stade de développement, il est important de mener cet examen le plus précisément possible. D'après Nieuwkoop et Faber (8), le premier repère de développement permettant de sélectionner les larves ayant atteint le stade 51 est constitué par la morphologie des pattes postérieures. Les caractéristiques morphologiques des membres postérieurs sont donc à examiner au microscope. Le guide complet de Nieuwkoop et Faber (8) est consulté pour collecter les informations complètes sur la détermination du stade de développement des têtards, néanmoins, il est aussi possible de caractériser ce stade de manière fiable au moyen de critères morphologiques apparents. Le tableau suivant est un outil permettant de simplifier et rationaliser le procédé de détermination du stade de développement tout au long de l'étude, en identifiant les critères morphologiques apparents associés aux différents stades dans l'hypothèse d'un développement normal.

▼M6

Tableau 2.

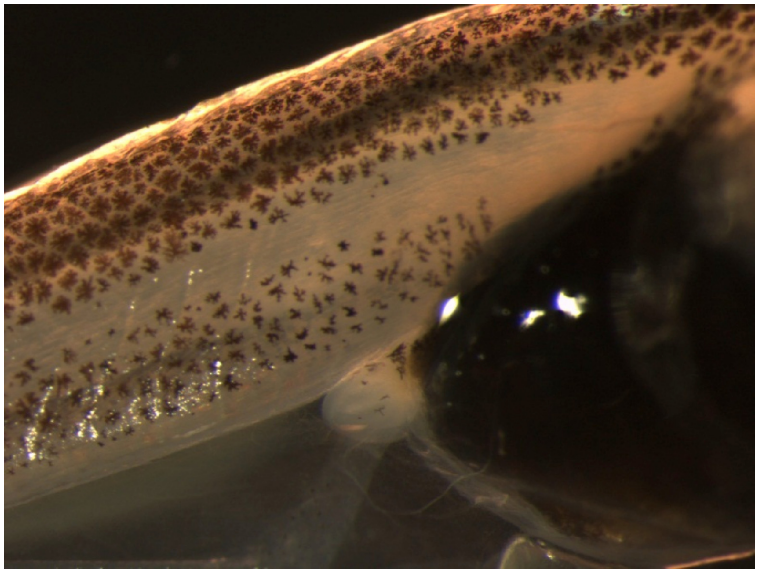
Critères morphologiques apparents pour la détermination du stade de développement d'après les recommandations de Nieukoop et Faber

Critères morphologiques apparents	Stade de développement															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Pattes postérieures	X	X	X	X	X	X	X									
Pattes antérieures						X	X	X	X	X						
Structure crâniofaciale										X	X	X	X			
Morphologie du nerf olfactif											X	X	X			
Longueur de la queue													X	X	X	X

23. L'essai n'est lancé que lorsque tous les têtards ont atteint le stade 51. Le principal critère morphologique apparent pour la détermination du stade de développement est la morphologie des pattes postérieures, comme cela est démontré dans la Figure 1.

Figure 1.

Morphologie des pattes postérieures d'un têtard de X. laevis au stade 51.



24. En plus de la sélection en fonction du stade de développement, il est également possible d'effectuer une sélection des animaux destinés à l'expérimentation en fonction de leur taille. À cette fin, la longueur totale du corps (différente de la longueur museau-cloaque — LMC) est relevée au jour 0 chez un sous-échantillon d'environ 20 têtards au stade NF 51. Une fois que la moyenne de la longueur totale du corps a été calculée pour ce groupe d'individus, les valeurs limites minimum et maximum de cette longueur pour les individus admis dans l'essai sont fixées respectivement en soustrayant et en ajoutant 3 mm à la moyenne établie précédemment (les valeurs moyennes de la longueur totale du corps sont comprises entre 24,0 et 28,1 mm chez les têtards de stade 51). La détermination du stade de développement demeure néanmoins le principal paramètre pour évaluer si un animal est prêt pour l'essai ou non. Les têtards présentant des malformations manifestes ou des blessures sont exclus de l'essai.

▼**M6**

25. Les individus répondant aux critères liés au stade décrits précédemment sont mis de côté dans un vivier rempli avec l'eau d'élevage pure, jusqu'à la fin du processus de détermination du stade de développement. Une fois que cette étape est terminée, les larves sont reparties aléatoirement dans les viviers destinés au traitement d'exposition, jusqu'à ce que chacun d'eux compte 20 animaux. Chacun de ces viviers fait alors l'objet d'une inspection afin de détecter les individus d'apparence anormale, présentant notamment des blessures, une nage inhabituelle, etc. Quand leur aspect n'est absolument pas sain, les têtards sont retirés des viviers de traitement et remplacés par les larves nouvellement sélectionnées dans le vivier commun.

Observations

26. Des informations plus approfondies sur les procédures de clôture de l'essai et le traitemeny des têtards sont disponibles dans le document d'orientation de l'OCDE intitulé Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology (9).

Mesures au jour 7

27. Au jour 7, cinq têtards par répliquat sont prélevés au hasard dans chaque vivier d'essai. La procédure aléatoire employée garantie une même probabilité d'être sélectionné à tous les individus. Pour cela, toute méthode de choix aléatoire est valable, mais tous les têtards sont capturés dans un filet. Les larves non retenues sont rendues à leur vivier d'origine, et les individus sélectionnés sont euthanasiés humainement en les plaçant dans 150 à 200 mg/l de MS-222, par exemple, convenablement tamponné à pH 7,0 avec du bicarbonate de sodium. Les têtards euthanasiés sont rincés à l'eau, séchés, puis pesés au milligramme près. La longueur des pattes postérieures, la longueur museau-cloaque et le stade de développement (évalués à l'aide d'un microscope binoculaire à dissection) sont déterminés pour chaque larve.

Mesures au jour 21 (clôture de l'essai)

28. À la fin de l'essai (jour 21), les têtards restants sont euthanasiés humainement en les plaçant dans 150 à 200 mg/l de MS-222, par exemple, convenablement tamponné avec du bicarbonate de sodium, comme précédemment. Ils sont alors rincés à l'eau, séchés, puis pesés au milligramme près. Le stade de développement, la LMC et la longueur des pattes postérieures sont déterminés pour chaque têtard.

29. Les larves sont ensuite toutes placées dans le fixateur de Davidson durant 48 à 72 h, soit comme échantillon de corps entier, soit en ne conservant que les tissus de la tête, y compris la mandibule, pour les évaluations histologiques. Pour l'histopathologie, l'échantillonnage exige un total de cinq têtards par vivier répliqué. La hauteur des cellules folliculaires dépendant du stade de développement (10), l'approche la mieux adaptée pour l'échantillonnage consiste à sélectionner les individus ayant atteint le même stade, autant que possible. Pour choisir des têtards de même stade de développement, il faut que ce stade soit connu chez tous les animaux avant la sélection et le traitement des données collectées et conservées. Il est nécessaire d'achever cette détermination des stades de développement car des différences de développement normales se traduisent par des différentiels dans la distribution des divers stades au sein de chaque vivier répliqué.

30. Les animaux sélectionnés pour l'histopathologie (n = 5 pour chaque répliquat) correspondent au stade médian observé chez les témoins (répliquats regroupés), autant que possible. S'il se trouve des viviers répliqués comptant plus de cinq larves au stade approprié, cinq individus sont alors sélectionnés au hasard.

▼M6

31. À l'inverse, si certains viviers répliqués contiennent moins de cinq animaux au stade approprié, des individus sont choisis de manière aléatoire au sein de la population de stade immédiatement inférieur ou supérieur pour rejoindre le groupe échantillon, jusqu'à ce que cet ensemble compte cinq larves par répliquat. Idéalement, le choix de prélever des larves au sein de la population de stade immédiatement inférieur ou supérieur pour compléter l'échantillon est étayé par l'évaluation globale de la distribution des stades de développement dans les populations témoins et soumises aux traitements chimiques. Ainsi, si l'exposition chimique entraîne un retard de développement, les larves complémentaires sont alors prélevées dans la population présentant le stade immédiatement inférieur. Inversement, si l'exposition chimique entraîne une accélération du développement, les larves complémentaires sont prélevées dans la population présentant le stade immédiatement supérieur.

32. En cas de perturbation sévère du développement des têtards en raison du traitement avec la substance chimique d'essai, la distribution des stades observés dans la population exposée chimiquement est susceptible de ne pas correspondre à la médiane des stades de développement calculée pour les témoins. Dans ces cas uniquement, le processus de sélection est modifié et se fonde sur un stade différent de la médiane des stades de développement observés pour les témoins, afin d'obtenir un échantillon de larves destinées à l'histologie de la thyroïde cohérent en termes de stade. En outre, si les stades demeurent indéterminés (dans les cas d'asynchronie), il convient de choisir au hasard cinq têtards dans chaque répliquat, pour les analyses histologiques. Les raisons motivant l'intégration dans l'échantillon de toute larve présentant un stade de développement différent de la valeur médiane chez les témoins sont rapportées.

Détermination des observations et effets biologiques

33. Pendant la phase d'exposition de 21 jours, le relevé des principales observations rapportées a lieu aux jours 7 et 21, néanmoins une observation quotidienne de la population étudiée est nécessaire. Le Tableau 3 présente un aperçu de l'ensemble des observations rapportées et le moment où elles sont relevées. Des informations plus détaillées concernant les techniques relatives au relevé des observations biologiques et aux évaluations histologiques sont disponibles dans le document d'orientation de l'OCDE (9)

Tableau 3.

Date et fréquence des observations rapportées au cours de l'EMA.

Observations rapportées	Quotidiennement	Jour 7	Jour 21
— Mortalité	•		
— Stade de développement		•	•
— Longueur des pattes postérieures		•	•
— Longueur museau-cloaque (LMC)		•	•
— Poids du corps humide		•	•
— Histologie de la glande thyroïde			•

▼M6

Observations rapportées

34. Le stade de développement, la longueur des pattes postérieures, la LMC et le poids humide constituent les observations morphologiques de l'EMA; chacune de ces observations fait l'objet d'une discussion ci-après. Des informations techniques complémentaires sur la collecte de ces données, sont disponibles dans le document d'orientation de l'OCDE cité en référence, qui comprend entre autres les procédures d'analyse assistée par ordinateur recommandées.

Stade de développement

35. Le stade de développement des têtards de *X. laevis* est déterminé à l'aide des critères d'évaluation établis par Nieuwkoop et Faber (8). Les données relatives au stade de développement permettent de déceler si celui-ci est accéléré, asynchrone, retardé ou non affecté. Une accélération ou un retard de développement sont détectés en comparant les stades médians atteints chez les témoins et les groupes traités, respectivement. Une asynchronie est rapportée quand les tissus observés ne présentent aucune anomalie ou malformation, mais que le rythme de la morphogenèse ou le développement des différents tissus sont en décalage chez un même individu.

Longueur des pattes postérieures

36. La différenciation et la croissance des pattes postérieures sont contrôlées par les hormones thyroïdiennes et constituent des critères de développement majeurs, déjà employés pour la détermination du stade. Le développement des pattes postérieures est employé comme donnée qualitative pour déterminer le stade de développement, cependant, dans le cas présent, il s'agit d'un paramètre d'évaluation quantitatif. Par voie de conséquence, la longueur des pattes postérieures est mesurée pour détecter des effets sur l'axe thyroïdien (graphique 2). Par souci de cohérence, cette longueur est mesurée sur la patte postérieure gauche. La longueur des pattes postérieures est relevée aux jours 7 et 21 de l'essai. Au jour 7, cette valeur est mesurée directement, comme l'illustre le graphique 2. En revanche, le relevé de la longueur des pattes postérieures au jour 21 est compliqué par les courbures du membre. Aussi les mesures au jour 21 doivent- elles être prises à partir de la paroi corporelle puis suivre la ligne médiane de la patte, en se pliant à toutes les déviations angulaires. Des changements de longueur des pattes postérieures observés dès le jour 7, même s'ils ne sont pas évidents au jour 21, sont considérés comme des signes potentiels d'une activité sur la thyroïde. Les longueurs sont mesurées sur des photos numériques, au moyen de logiciels d'analyse d'image, procédé décrit dans le document d'orientation de l'OCDE intitulé Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology (9).

Longueur et poids humide du corps

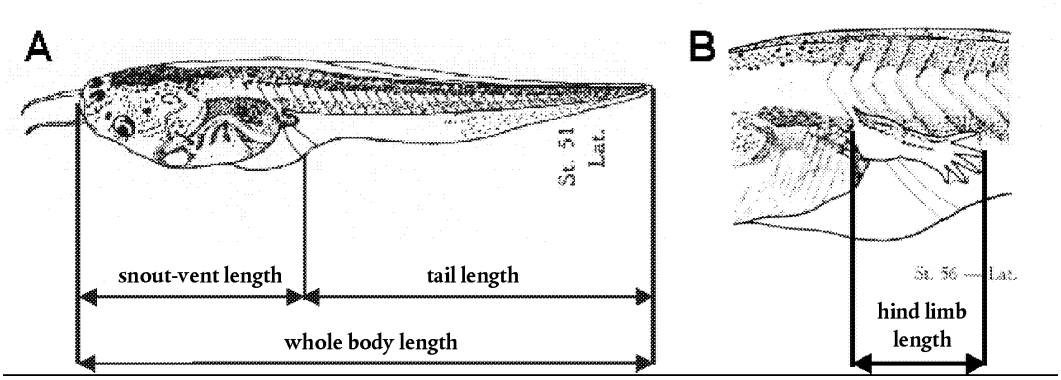
37. Le protocole d'essai comprend la caractérisation de la longueur museau-cloaque (LMC) (Figure 2) et du poids humide, en vue d'évaluer les effets potentiels des substances chimiques d'essai sur la vitesse de croissance des têtards, par comparaison avec un groupe témoin. Par ailleurs, ces valeurs sont utiles pour détecter la toxicité générale de la substance chimique d'essai. Dans la mesure où l'élimination du film d'eau avant la pesée est susceptible de stresser les têtards et de leur infliger des blessures cutanées, de tels relevés sont limités à un sous-échantillon au jour 7, avant d'être effectués sur l'ensemble des animaux à la fin de l'essai (jour 21). À des fins de cohérence, il convient de considérer l'aspect crânien du cloaque comme la limite de la queue, pour la mesure.

38. La longueur museau-cloaque (LMC) sert à évaluer la croissance des têtards, comme l'illustre la Figure 2.

▼M6

Figure 2.

(A) Types de mesures de la longueur du corps et (B) de la longueur des pattes postérieures chez les têtards de X. laevis (1).



Histologie de la glande thyroïde

39. Les observations du stade de développement et de la longueur des pattes postérieures sont importantes pour évaluer les changements du développement métamorphique liés à l'exposition, cependant, un retard de développement ne saurait être considéré en soi comme le signe d'une activité antithyroïdienne. Certaines modifications ne sont observables qu'au cours d'analyses histopathologiques de routine. Les critères de diagnostic comprennent l'hypertrophie/atrophie de la glande thyroïde, l'hypertrophie des cellules folliculaires, l'hyperplasie des cellules folliculaires, et, en tant que critères qualitatifs complémentaires: la superficie de la lumière folliculaire, la qualité des colloïdes ainsi que la taille/forme des cellules folliculaires. Le grade de sévérité attribué (sur 4 grades) est consigné. Des informations complémentaires sur l'obtention et le traitement des échantillons destinés à l'analyse histologique, et sur la mise en œuvre de telles analyses sur les échantillons tissulaires sont disponibles dans les documents intitulés «Amphibian Metamorphosis Assay: Part 1 — Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation» et «Amphibian Metamorphosis Assay: Part 2 — Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading and atlas» (9). Les laboratoires menant cet essai pour la ou les premières fois sont invités à recueillir les conseils de pathologistes expérimentés pour se former, avant de s'engager dans l'analyse histologique et l'évaluation de la glande thyroïde. Les changements aussi importants que manifestes observés sur les paramètres morphologiques indiquant une accélération du développement ou une asynchronie peuvent dispenser du besoin d'effectuer des analyses histologiques sur les glandes thyroïdes. L'absence de modifications morphologiques évidentes ou de retard de développement attesté justifie toutefois le recours aux analyses histologiques.

Mortalité

40. L'ensemble des viviers est suivi quotidiennement pour détecter les têtards morts et contrôler le nombre de larves correspondant à chaque vivier. Il convient de consigner la date, la concentration et le numéro du vivier pour tout cas de mortalité. Les animaux morts sont retirés du vivier d'essai dès qu'ils sont identifiés. Les taux de mortalité supérieurs à 10 % sont des indicateurs potentiels de conditions d'essai mal adaptées, ou d'effets toxiques de la substance chimique d'essai.

Observations complémentaires

41. L'observation d'un comportement anormal, de malformations très visibles et de lésions est consignée. Il convient de noter la date, la concentration et le numéro du vivier pour tout cas de comportement anormal, de malformations évidentes et de lésions. Un comportement normal se caractérise

▼M6

par la suspension des têtards dans la colonne d'eau, la queue élevée au-dessus de la tête, un battement léger de la queue sur un rythme régulier, des remontées à la surface, un opercule mobile, et la réponse au stimulus. Inversement, un comportement anormal implique notamment des animaux flottant à la surface, immobiles au fond du vivier, une nage inversée ou irrégulière, un manque d'activité à la surface, et l'absence de réponse au stimulus. En outre, les différences de consommation de nourriture entre les groupes de traitement sont consignées lorsqu'elles sont importantes. Les malformations apparentes et les lésions se manifestent éventuellement par des anomalies morphologiques (par exemple difformité des membres), des lésions hémorragiques et des infections bactériennes ou fongiques, entre autres. Ces déterminations sont d'ordre qualitatif, et sont considérées comme analogues aux signes cliniques de maladies/stress, et toujours en comparaison avec les animaux témoins. Une occurrence ou un taux d'occurrence supérieur dans les viviers exposés par rapport au groupe témoin constitue la preuve d'une toxicité manifeste.

DONNÉES ET RAPPORTS

Collecte des données

42. Toutes les données sont collectées à l'aide de systèmes électroniques ou manuels conformes aux bonnes pratiques de laboratoire (BPL). Les données de l'étude comprennent:

Substance chimique d'essai:

— Caractérisation de la substance chimique d'essai: propriétés physico-chimiques; informations sur la stabilité et la biodégradabilité.

— Informations et données chimiques: méthode et fréquence de préparation des dilutions. Les informations sur les substances chimiques d'essai détaillent leurs concentrations réelle et nominale, et, dans certains cas, celles de produits chimiques qui ne sont pas la substance d'essai initiale, le cas échéant. Les mesures sur la substance d'essai peuvent aussi bien concerner les solutions de réserve que les solutions d'essai.

— Solvant (s'il ne s'agit pas de l'eau pure): justification du choix et caractérisation de ce solvant (nature, concentration employée).

Conditions de l'essai:

— Registres opérationnels: ils compilent les observations relatives au fonctionnement du système d'essai ainsi qu'à l'environnement et aux infrastructures qui y participent. Habituellement, les registres comprennent: la température ambiante, la température d'essai, la période d'exposition lumineuse, l'état des éléments cruciaux du système d'exposition (notamment les pompes, les compteurs de cycles, les pressions), les débits, les niveaux d'eau, les renouvellements des bouteilles de réserve, et les rapports sur l'alimentation. Les paramètres généraux sur la qualité de l'eau incluent: le pH, l'oxygène dissous, la conductivité, l'iode total, l'alcalinité et la dureté.

— Déviations par rapport à la méthode d'essai: compile toutes les informations ou descriptions narratives des déviations consenties par rapport à la méthode d'essai.

Résultats:

— Observations et données biologiques: elles comprennent les observations quotidiennes sur la mortalité, la consommation de nourriture, les nages anormales, la léthargie, la perte d'équilibre, les malformations, les lésions etc. Les observations et données collectées à intervalle prédéterminé incluent: le stade de développement, la longueur des pattes postérieures, la longueur museau-cloaque et le poids humide.

▼M6

— Techniques d'analyse statistique utilisées et justification de leur emploi; la présentation des résultats de cette analyse statistique sera de préférence sous forme de tableau.

— Données histologiques: elles incluent les descriptions narratives ainsi que le degré de sévérité et le taux d'incidence des observations spécifiques, conformément au document d'orientation sur l'histopathologie.

— Observations ad hoc: ces observations concernent toute description narrative de l'étude ne correspondant pas aux catégories décrites précédemment.

Rapports de données

43. L'Appendice 2 propose des feuilles de calcul relatives au relevé quotidien des données, qui constituent une aide utile pour entrer les valeurs et calculer les statistiques globales. De plus, des tableaux de rapport sont fournis, ce qui facilite la communication des récapitulatifs des données concernant les effets mesurés. Les tableaux de rapport pour l'évaluation histologique sont disponibles dans l'Appendice 2.

Critères de performance et acceptabilité/validité de l'essai

44. En général, des déviations importantes par rapport à de la méthode d'essai se traduisent par des données qui ne sont pas acceptables pour être interprétées et faire l'objet de rapports. Aussi les critères suivants, détaillés dans le tableau 4, ont-ils été développés en vue d'orienter la détermination de la qualité de l'essai effectué et la performance générale des individus témoins.

Tableau 4.

Critères de performance pour l'EMA.

Critères	Limites acceptables
Concentrations d'essai	Maintenues ≤ 20 % CV (variabilité de la concentration d'essai mesurée) sur les 21 jours de l'essai
Mortalité chez les témoins	≤ 10 % — la mortalité dans chaque répliquat des témoins ne dépasse pas 2 têtards
Stade de développement médian chez les témoins à la fin de l'essai	57
Répartition du stade de développement dans le groupe témoin	Les individus correspondant respectivement à 10 % et à 90 % de la distribution du stade de développement ne présentent pas une différence de plus de 4 stades.
Oxygène dissous	≥ 40 % de la saturation de l'air (*)
pH	Le pH demeure entre 6,5 et 8,5. Les différentiels interrépliquat et intertraitement n'excèdent pas 0,5.
Température de l'eau	22 ± 1 °C — Les différentiels interrépliquat et intertraitement n'excèdent pas 0,5 °C.
Concentrations d'essai hors toxicité manifeste	≥ 2
Performance des répliquats	≤ 2 répliquats sur l'ensemble de l'essai peuvent être compromis

▼**M6**

Critères	Limites acceptables
Conditions particulières pour l'utilisation d'un solvant	Si un solvant est utilisé comme véhicule, il convient de mettre en place un témoin pour le solvant et pour l'eau, et les résultats correspondants sont consignés.
	Les différences statistiquement significatives entre les groupes témoins pour le solvant et pour l'eau sont traitées de manière particulière. Voir ci-dessous pour plus d'informations
Conditions particulières pour le recours à un système de renouvellement statique	Les analyses chimiques représentatives effectuées avant et après le renouvellement sont rapportées.
	La teneur en ammoniaque est calculée juste avant le renouvellement.
	Tous les paramètres liés à la qualité de l'eau récapitulés dans le Tableau 1 de l'Appendice 1 sont évalués juste avant le renouvellement.
	La période entre deux renouvellements ne dépasse pas 72 h.
	Un calendrier d'alimentation adapté (50 % de la ration quotidienne de l'aliment pour têtards du commerce).

(*) L'aération de l'eau peut être maintenue au moyen de bulleurs. Il est conseillé de placer les bulleurs à des endroits où ils n'entraînent pas de stress excessif chez les têtards.

Validité de l'essai

45. Pour être jugé acceptable/valide, un essai satisfait les exigences suivantes:

Validité d'une expérience menée dans le cadre de l'essai, pour conclure à une substance négative en termes d'activité sur la thyroïde:

(1) Pour tous les traitements considérés (y compris les témoins), la mortalité n'excède pas 10 %. Pour un répliquat donné, la mortalité ne dépasse pas trois têtards; dans le cas contraire, le répliquat est jugé compromis.

(2) Au moins deux niveaux de traitement dont les quatre répliquats demeurent non compromis sont nécessaires pour effectuer les analyses.

(3) Au moins deux niveaux de traitement exempts de toxicité manifeste sont nécessaires pour effectuer les analyses.

Validité d'une expérience menée dans le cadre de l'essai, pour conclure à une substance positive en termes d'activité sur la thyroïde:

(1) La mortalité observée est limitée à deux têtards par répliquat dans le groupe témoin, au maximum.

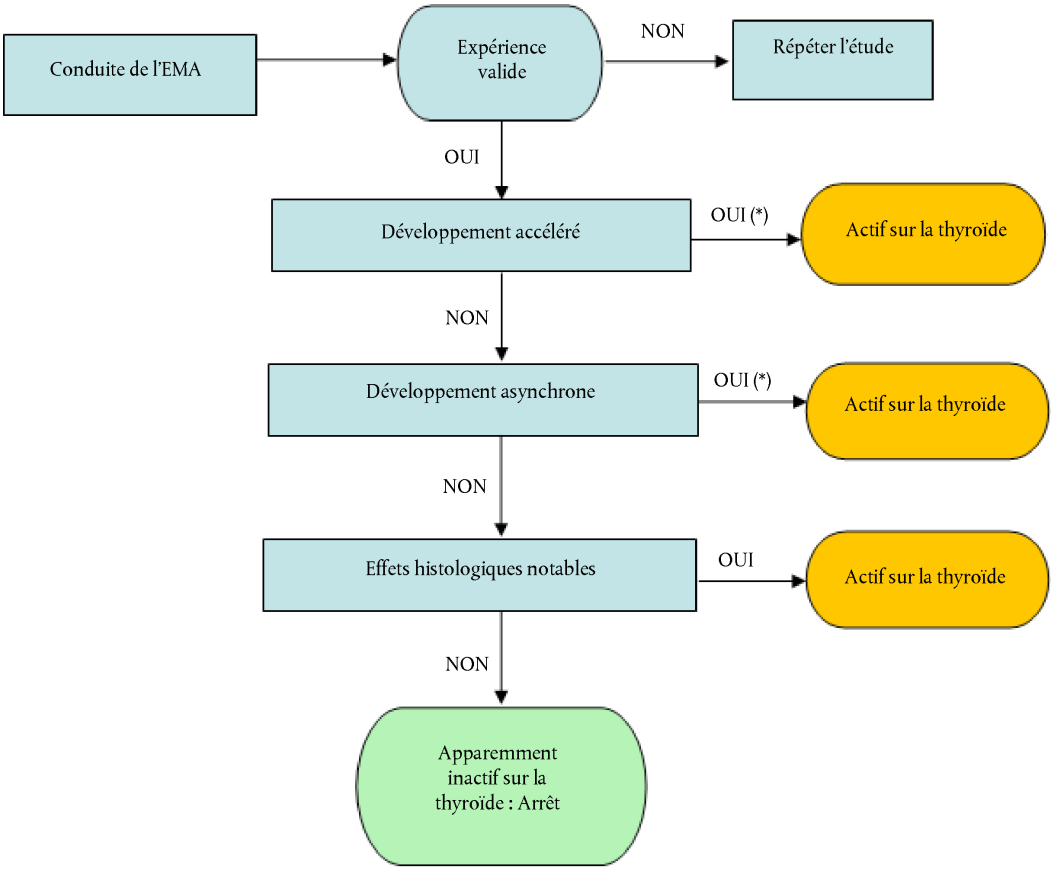
Diagramme de décision dans la conduite de l'EMA

46. Un diagramme de décision a été créé pour l'EMA afin d'offrir une assistance logique dans la conduite et l'interprétation des résultats du bioessai (voir le diagramme de décision dans le Graphique 3). Ce diagramme de décision accorde, par essence, une forte pondération aux observations relevées que sont le développement accéléré, asynchrone, ou l'histopathologie thyroïdienne, tandis que les autres observations susceptibles d'être également affectées par la toxicité générale, comme le retard de développement, la longueur museau-cloaque et le poids du corps humide sont caractérisés par une pondération moindre.

▼M6

Figure 3.

Diagramme de décision dans la conduite de l'EMA



(*) Certaines autorités réglementaires peuvent réclamer une histologie, malgré l'observation de différences importantes dans le développement accéléré et asynchrone. L'organisme en charge de l'essai est invité à consulter les autorités compétentes avant le début des expériences, afin de déterminer les relevés d'observation requis.

Développement accéléré (évalué avec le stade de développement, la LMC et la longueur des pattes postérieures)

47. On sait que le développement accéléré est dû uniquement aux effets liés aux hormones thyroïdiennes. Parmi ces effets figurent ceux qui affectent les tissus périphériques, notamment dus à l'interaction directe avec les récepteurs des hormones thyroïdiennes (par exemple T4), ou ceux qui entraînent une altération des concentrations d'hormones thyroïdiennes en circulation. Chacun de ces cas est jugé suffisant pour conclure à une activité de la substance sur la thyroïde. Le développement accéléré est évalué de l'une ou l'autre manière suivante: soit le stade de développement général est déterminé en se basant sur l'approche standard détaillée par Nieuwkoop et Faber (8), soit les caractères morphologiques spécifiques peuvent être quantifiés, par exemple la longueur des pattes postérieures, aux jours 7 et 21, car ce critère réagit positivement aux activités agonistes sur les récepteurs des hormones thyroïdiennes. Si les statistiques dégagent une accélération significative du développement ou de la croissance des pattes postérieures, l'essai indique que la substance présente une activité sur la thyroïde.

▼**M6**

48. L'évaluation d'un éventuel développement accéléré chez les animaux de l'essai par rapport à la population témoin se fonde sur les résultats des analyses statistiques menées sur les quatre relevés d'observations suivants:

— longueur des pattes postérieures (normalisée par la LMC) au jour 7 de l'étude

— longueur des pattes postérieures (normalisée par la LMC) au jour 21 de l'étude

— stade de développement au jour 7 de l'étude

— stade de développement au jour 21 de l'étude

49. Les analyses statistiques portant sur la longueur des pattes postérieures exploitent les données relevées pour le membre postérieur gauche. La normalisation de la longueur des pattes postérieures se fait en calculant le rapport entre cette longueur et la longueur museau-cloaque pour chaque individu. Les moyennes des valeurs normalisées sont alors comparées. L'accélération du développement est alors signalée par une forte hausse de la moyenne des longueurs des pattes postérieures (normalisées) mesurées dans le groupe traité chimiquement, par rapport à celle du groupe témoin, au jour 7 et/ou 21 de l'étude (voir Appendice 3).

50. Les analyses statistiques du stade de développement sont effectuées avec les stades évalués conformément aux critères morphologiques décrits par Nieuwkoop et Faber (8). L'accélération du développement est caractérisée quand les analyses multi-quantiques détectent une forte hausse des valeurs du stade de développement dans le groupe traité chimiquement, par rapport à celles du groupe témoin, au jour 7 et/ou 21 de l'étude.

51. Dans la méthode de l'essai de métamorphose des amphibiens, un effet significatif observé sur l'un quelconque des quatre relevés d'observations mentionnés ci-dessus est considéré comme suffisant pour conclure à un développement accéléré. Ainsi, des effets significatifs sur la longueur des pattes postérieures relevés à un moment donné n'ont pas besoin d'être confirmés: ils n'impliquent pas nécessairement que la même tendance soit attestée lors de l'observation suivante, ni que le stade de développement soit affecté de la même manière, au même moment. De la même manière, les effets significatifs sur le stade de développement relevés à un moment donné n'ont pas besoin d'être confirmés: ils n'impliquent pas nécessairement que la même tendance soit attestée lors de l'autre observation, ni que la longueur des pattes postérieures soit affectée de la même manière, au même moment. Néanmoins, si des effets significatifs touchent plusieurs des observations rapportées, ils renforcent les preuves en faveur d'un développement accéléré.

Développement asynchrone (évalué avec le stade de développement)

52. Un développement asynchrone se caractérise par un décalage dans le rythme de morphogenèse ou de développement des différents tissus chez un même têtard. L'impossibilité d'établir clairement le stade de développement d'un individu en se basant sur la série d'observations morphologiques considérées comme typiques d'un stade donné indique que les tissus se développent de manière asynchrone, à travers la métamorphose. Un développement asynchrone est un signe d'activité sur la thyroïde. Les seuls modes d'action connus entraînant une telle asynchronie sont fondés sur les effets de produits chimiques sur l'action périphérique et/ou le métabolisme associés aux hormones thyroïdiennes dans les tissus en développement, comme on l'observe avec les inhibiteurs de la déiodinase.

▼**M6**

53. L'évaluation du développement asynchrone chez les animaux inclus dans l'essai par rapport au groupe témoin s'appuie sur les examens morphologiques d'ensemble effectués sur les larves aux jours 7 et 21.

54. La description du développement normal des xénopes par Nieuwkoop et Faber (8) constitue le cadre permettant d'identifier l'ordre séquentiel du remodelage des tissus attendu. Le terme «développement asynchrone» se rapporte spécifiquement aux déviations dans le développement morphologique général des têtards empêchant la détermination du stade de développement conformément aux références de Nieuwkoop et Faber (8), parce que les relevés morphologiques clés indiquent des stades différents.

55. Comme le suppose le terme «développement asynchrone», seuls les cas présentant des déviations de la progression du remodelage de tissus spécifiques par rapport au remodelage d'autres tissus sont pris en considération. Parmi les phénotypes classiques figurent le retard ou l'absence d'apparition des pattes antérieures, tandis que les tissus des pattes postérieures et de la queue se développent normalement ou de manière avancée, ou la résorption précoce des branchies par rapport au stade de morphogenèse des membres postérieurs et à la résorption de la queue. Un animal sera enregistré comme présentant un développement asynchrone s'il n'est pas possible de lui attribuer un stade dans la mesure où il ne répond pas à la majorité des critères de Niewkoop et Faber correspondants (8), ou si une ou plusieurs caractéristiques clés se montrent très retardées ou accélérées (par exemple queue complètement résorbée alors que les pattes antérieures ne sont pas apparues). Cette évaluation est d'ordre qualitatif, et intègre l'intégralité des caractéristiques répertoriées par Nieuwkoop et Faber (8). Il n'est toutefois pas nécessaire de consigner l'état de développement de chacun de ces critères caractéristiques chez les animaux observés. Les individus chez lesquels un développement asynchrone est diagnostiqué ne se voient pas attribuer de stade de développement au sens de Nieuwkoop et Faber (8).

56. Ainsi, un des critères principaux pour désigner les anomalies du développement morphologique comme «développement asynchrone» réside dans le décalage entre le rythme relatif au remodelage et à la morphogenèse des tissus, tandis que la morphologie des tissus affectés ne présente pas d'anomalies évidentes. À titre d'exemple de cette interprétation des anomalies morphologiques importantes, un retard dans la morphogenèse des pattes postérieures par rapport au développement des autres tissus suffira à conclure à un «développement asynchrone», contrairement aux cas d'absence de ces membres postérieurs, d'anomalies digitales (par exemple ectrodactylie, polydactylie) ou autres malformations des pattes évidentes.

57. Dans ce contexte, les principaux critères morphologiques à évaluer en termes d'avancée coordonnée de la métamorphose comprennent la morphogenèse des pattes postérieures et antérieures, l'apparition des pattes antérieures, le stade de résorption de la queue (en particulier la résorption de la nageoire caudale) et la morphologie de la tête (par exemple la taille des branchies et le stade où elles se résorbent, la morphologie de la mandibule, ou la protrusion du cartilage de Meckel).

58. Selon le mécanisme d'action de la substance chimique, différents phénotypes morphologiques importants sont susceptibles d'apparaître. Parmi les phénotypes classiques, on compte le retard ou l'absence d'apparition des pattes antérieures, malgré un développement normal voire accéléré des membres postérieurs et des tissus de la queue, ainsi que la résorption précoce des branchies par rapport aux pattes postérieures et au remodelage de la queue.

▼**M6**

Histopathologie

59. Si le produit chimique ne présente pas de toxicité manifeste et n'entraîne pas d'accélération ou d'asynchronie du développement, l'histopathologie de la glande thyroïde est alors étudiée, à l'aide du document d'orientation approprié (9). En l'absence de toxicité, le retard de développement est un indicateur fort d'activité anti-thyroïdienne. Cependant, l'étude du stade de développement est moins sensible et permet moins d'établir un diagnostic que les analyses histopathologiques de la glande thyroïde. Dans ce cas, ces analyses sont donc requises. Des effets sur l'histologie des glandes thyroïdes ont été démontrés, même lorsque le développement demeure normal. Si des changements sur l'histopathologie de la thyroïde sont observés, la substance chimique est alors considérée comme présentant une activité sur la thyroïde. Inversement, si les glandes thyroïdes ne souffrent d'aucune lésion histologique et qu'il n'y a pas de retard de développement, le produit chimique est considéré comme inactif sur la thyroïde. La raison de cette distinction repose sur le fait que la thyroïde est sous l'influence de la HST (hormone de stimulation thyroïdienne), si bien que toute substance chimique altérant suffisamment la circulation des hormones thyroïdiennes pour affecter la sécrétion de HST entraîne alors des modifications histopathologiques dans les glandes thyroïdes. Divers mécanismes et modes d'action sont susceptibles de réduire la circulation des hormones thyroïdiennes. Ainsi, même si la concentration des hormones thyroïdiennes représente une indication de l'effet sur la thyroïde, cet élément ne suffit pas à préciser le mécanisme ou le mode d'action associé à la réponse.

60. Ces effets mesurés sur la glande thyroïde ne se prêtant pas aux approches statistiques de base, la détermination d'un effet consécutif à une exposition chimique s'appuie sur l'expertise d'un pathologiste.

Retard de développement (évalué avec le stade de développement, la longueur des pattes postérieures, le poids corporel et la LMC)

61. Des retards de développement peuvent apparaître du fait de mécanismes anti-thyroïdiens ou d'une toxicité indirecte. De légers retards de développement associés à des signes importants de toxicité indiquent probablement un effet toxique non spécifique. L'évaluation de la toxicité non liée à la thyroïde constitue un élément primordial de l'essai, afin de diminuer la probabilité d'apparition de faux positifs. Une mortalité excessive est un signe évident que d'autres mécanismes toxiques entrent en jeu. De la même manière, de légers retards de croissance, évalués au moyen du poids humide et/ou de la LMC, suggèrent également une toxicité non liée à la thyroïde. Une augmentation apparente de la croissance est souvent observée avec les substances chimiques qui perturbent le développement normal. La présence d'animaux plus développés n'indique donc pas nécessairement une toxicité non thyroïdienne. En revanche, la croissance n'est pas le seul élément étayant la détermination de la toxicité sur la thyroïde. Elle est plutôt associée au stade de développement et à l'histopathologie de la thyroïde afin de juger de l'activité sur la thyroïde. D'autres observations sont prises en compte pour déterminer la toxicité manifeste, y compris les œdèmes, les lésions hémorragiques, la léthargie, une baisse de la consommation de nourriture, une nage erratique/altérée, etc. Si une toxicité manifeste se déclare pour toutes les concentrations testées, il convient de réévaluer la substance d'essai dans une fourchette de concentrations plus basse avant de conclure à une éventuelle activité sur la thyroïde.

62. En l'absence de signes de toxicité manifeste, les retards de développement statistiquement significatifs indiquent que le produit chimique est actif sur la thyroïde (par un mécanisme antagoniste). En outre, s'il n'existe pas de réponse statistiquement marquée, cette observation peut être complétée par les résultats de l'histopathologie de la thyroïde.

▼M6

Analyses statistiques

63. Il est préférable d'effectuer ces analyses statistiques en suivant les procédures décrites dans le document intitulé Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application (11). En ce qui concerne l'ensemble des paramètres d'évaluation quantitatifs et continus (longueur des pattes postérieures, LMC, poids humide) correspondant à une fonction dose-réponse monotone, il convient d'appliquer le test de Jonckheere — Terpstra par méthode descendante afin de dégager un effet significatif du traitement.

64. Pour les paramètres d'évaluation continus ne correspondant pas à une fonction dose-réponse monotone, les données sont examinées en termes de normalité (de préférence avec les tests de Shapiro — Wilk ou d'Anderson — Darling) et d'homogénéité de la variance (en priorité avec le test de Levene). Les deux tests utilisent les données résiduelles d'une ANOVA. S'il est possible de substituer les jugements d'un expert à ces tests formels de normalité et d'homogénéité de la variance, ces derniers demeurent toutefois préférables. En cas de non-normalité ou d'hétérogénéité de la variance, une transformation visant à normaliser les données et stabiliser la variance est recherchée. Si les valeurs (éventuellement après transformation) présentent une distribution normale avec une variance homogène, le test de Dunnett permet de dégager les effets significatifs du traitement. Si les valeurs (éventuellement après transformation) présentent une distribution normale avec une variance hétérogène, les effets significatifs du traitement sont déterminés grâce au test de Tamhane — Dunnett, ou au test T3, ou encore avec le test U de Mann — Whitney — Wilcoxon. Dans le cas où aucune transformation visant à normaliser les données n'a été trouvée, les effets significatifs du traitement sont déterminés avec le test U de Mann — Whitney — Wilcoxon après corrections des p-valeurs selon la méthode Bonferroni — Holm. Le test de Dunnett s'applique indépendamment du test F de l'ANOVA, et le test Mann — Whitney est indépendant de tout test de Kruskall — Wallis global.

65. Aucune mortalité significative n'est attendue, néanmoins il convient de l'évaluer par méthode descendante avec le test de Cochran — Armitage lorsque les données se traduisent par une fonction dose- réponse monotone; dans les autres cas, c'est le test exact de Fisher avec correction de Bonferroni — Holm qui est appliqué.

66. Un éventuel effet significatif du traitement sur le stade de développement est évalué par méthode descendante au moyen du test de Jonckheere — Terpstra sur les médianes des répliquats. Une autre technique pour dégager un tel effet consiste à recourir à des analyses multi-quantiques avec le test de Jonckheere en se basant sur les résultats compris entre les 20^{e} et 80^{e} percentiles; comme cette méthode prend en compte des changements dans le profil de distribution, elle est préférable aux autres.

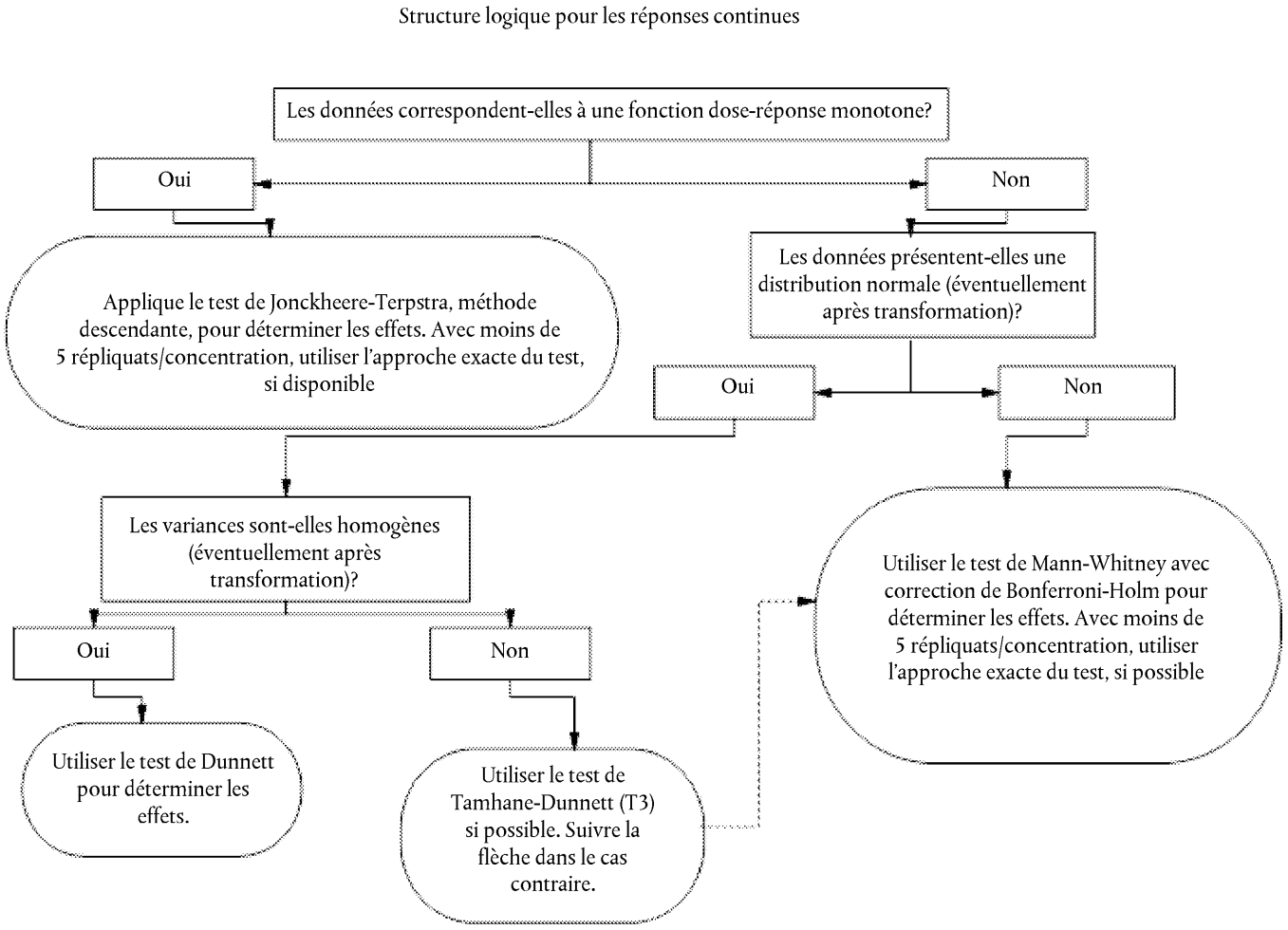
67. L'unité d'analyse correcte est le répliquat: ainsi, le test de Jonckheere — Terpstra ou le test U de Mann — Whitney exploitent les médianes des répliquats, tandis que le test de Dunnett analyse les moyennes des répliquats. Il est possible d'évaluer visuellement le caractère monotone de la fonction dose-réponse en examinant les moyennes ou médianes des répliquats et des traitements, ou bien par le biais de tests formels tels que ceux décrits précédemment (11). Si le nombre de répliquats par traitement ou pour les témoins est inférieur à cinq, il convient d'employer une approche fondée sur des permutations exactes, des tests de Jonckheere — Terpstra et Mann — Whitney, dans la mesure du possible. Pour tous les tests cités, on conclut à la significativité statistique au-dessus de 0,05.

68. La Figure 4 présente la structure logique d'exécution des tests statistiques sur les données continues.

▼M6

Figure 4.

Structure logique de l'approche statistique pour le traitement des données de réponse continues.



02008R0440 — FR — 16.10.2019 — 008.001 — 2222

▼M6

Considérations particulières pour l'analyse des données

Utilisation des traitements compromis

69. Plusieurs facteurs entrent en jeu pour déterminer si un répliquat ou l'intégralité d'un traitement présentent une toxicité manifeste et s'il convient alors de les exclure de l'analyse. Une toxicité manifeste se caractérise par une mortalité supérieure à deux individus dans un répliquat, mortalité qui ne saurait être imputable à une erreur technique, et s'explique donc par la toxicité. Parmi les signes supplémentaires de toxicité manifeste figurent l'hémorragie, les comportements anormaux, les nages anormales, l'anorexie ainsi que tout autre signe clinique de maladie. Des évaluations qualitatives s'avèrent parfois nécessaires pour les signes de toxicité sous-létale, toujours par rapport au groupe témoin dans l'eau pure.

Témoins associés au solvant

70. Un solvant n'est employé qu'en dernier ressort, après avoir considéré toutes les autres solutions de transport du produit chimique. Si l'option du solvant est néanmoins retenue, il est impératif de mettre en place conjointement un témoin constitué d'eau pure. À la clôture de l'essai, les effets potentiels du solvant font l'objet d'une évaluation. Pour cela, les résultats correspondant au groupe témoin du solvant sont comparés à ceux du groupe témoin de l'eau pure. Les relevés d'observation les plus pertinents dans ce cadre sont le stade de développement, la LMC et le poids humide, puisque ces relevés sont sensibles aux toxicités non thyroïdiennes. Si des différences statistiquement significatives entre les groupes témoins solvant et eau pure se dégagent sur ces relevés, il convient de déterminer les effets correspondants aux relevés d'observation en se fondant sur les observations relevées chez les témoins dans l'eau pure. Si, à l'inverse, il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes pour l'ensemble des observations relevées, les effets se fondent sur les observations relevées à la fois chez les témoins correspondant à l'eau de dilution et au solvant.

Groupes de traitement atteignant un stade de développement supérieur ou égal à 60

71. Au-delà du stade 60, le poids et la taille des têtards diminuent du fait de la résorption des tissus et de la baisse de leur masse d'eau en valeur absolue. Aussi les mesures du poids humide et de la LMC ne sont-elles plus appropriées aux analyses statistiques des différences de vitesse de croissance. Les valeurs du poids humide et de la longueur des animaux à un stade NF supérieur à 60 sont donc censurées et exclues des analyses des moyennes et des médianes des répliquats. Deux approches différentes sont envisageables pour analyser les paramètres de croissance.

72. L'une d'elle consiste à ne prendre en compte que les têtards à un stade de développement inférieur ou égal à 60 pour les analyses statistiques du poids humide et/ou de la LMC. Cette approche est supposée apporter des informations suffisamment solides sur la sévérité des éventuels effets sur la croissance, à condition que la proportion d'animaux exclus de l'analyse demeure limitée 20 %). Si un nombre plus important de têtards se caractérisent par un stade de développement dépassant 60 (≥ 20 %) dans une ou plusieurs concentrations nominales, il convient d'effectuer une ANOVA à deux facteurs intégrant une structure de variance sous-jacente pour évaluer les effets sur la croissance dus aux traitements chimiques sur l'ensemble des individus, tout en prenant en compte l'effet du stade de développement avancé sur la croissance. L'annexe 3 propose des orientations concernant l'ANOVA à deux facteurs (poids et longueur)..

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (2007) Final report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 — Optimisation of the Test Protocol. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et évaluations. N° 76, Paris.

▼**M6**

(2) OCDE (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 — Multi-chemical Interlaboratory Study. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et évaluations. N° 76. Paris

(3) OCDE (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et évaluations. No 92. Paris

(4) OCDE (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et évaluations. No 23. Paris

(5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729- 96(2002), Philadelpie, PA

(6) ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay — Xenopus (FETAX). E 1439-98

(7) Kahl,M.D., Russom,C.L., DeFoe,D.L. & Hammermeister,D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. Chemosphere 39, pp. 539-551

(8) Nieuwkoop,P.D. & Faber,J. (1994) Normal Table of Xenopus laevis. Garland Publishing, New York

(9) OCDE (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et évaluations. No 82. Paris

(10) Dodd,M.H.I. & Dodd,J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts,B. (ed.), Academic Press, New York, pp. 467-599

(11) OCDE (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et évaluations. No 54. Paris

(12) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Rapport. Aquatic Toxicology, 76; pp. 69-92.

▼M6

Appendice 1

Tableau 1

Conditions expérimentales de l'essai de métamorphose des amphibiens sur 21 jours.

Animaux d'essai		Larves de *Xenopus laevis*	
Stade larvaire initial		Stade 51 selon Nieuwkoop et Faber	
Durée d'exposition		21 jours	
Critères de sélection des larves		stade de développement et longueur totale (optionnelle)	
Concentrations d'essai		Minimum de 3 concentrations s'étendant sur environ une unité de l'ordre de grandeur	
Régime d'exposition		Avec écoulement continu (de préférence) et/ou renouvellement statique	
Vitesse d'écoulement dans le système d'essai		25 ml/min (renouvellement complet du volume environ toutes les 2,7 h)	
Principales observations rapportées — Calendrier des relevés		Mortalité	Quotidiennement
		Stade de développement	J7 et 21
		Longueur des pattes postérieures	J7 et 21
		Longueur museau-cloaque	J7 et 21
		Poids du corps humide	J7 et 21
		Histologie de la thyroïde	J21
Eau de dilution — Témoin du laboratoire		Eau du robinet déchlorée (filtrée sur charbon) ou source équivalente issue du laboratoire	
Densité de larves		20 larves/récipient d'essai (5/l)	
Solution d'essai/Récipient d'essai		4 - 10 l (10 - 15 cm d'eau minimum)/récipient d'essai en verre ou en acier inoxydable (p. ex. 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Réplication		4 récipients d'essai répliqués par concentration d'essai et témoin	
Taux de mortalité admis chez les témoins		≤ 10 % par récipient d'essai répliqué	
Fixation thyroïdienne	Nombre d'individus concernés	Tous les têtards (5/répliquat évalués initialement)	
	Région	Tête ou corps entier	
	Fluide de fixation	Fixateur de Davidson	
Alimentation	Nourriture	Sera Micron® ou équivalent	
	Quantité — Fréquence	Consulter le tableau 1 présentant le régime alimentaire adapté à l'emploi de Sera Micron®	
Éclairage	Période d'exposition lumineuse	12 h de lumière pour 12 h d'obscurité	

▼**M6**

	Intensité	600 à 2 000 lux (mesurée à la surface de l'eau)
Température de l'eau		22 ± 1 °C
pH		6,5 – 8,5
Concentration d'oxygène dissous (OD)		> 3,5 mg/l (> 40 % de la saturation de l'air)
Calendrier d'échantillonnage pour les analyses chimiques		Une fois par semaine (4 échantillonnages/essai)

▼**M6**

Appendice 2

Tableau pour le rapport des données brutes et résumées

Tableau 1

Informations générales sur la substance chimique d'essai

Informations sur la substance chimique chimique			
	Entrer la substance chimique, les unités de concentration et les traitements		
	Substance chimique d'essai:		
	Unités de concentration		
	Traitement 1		
	Traitement 2		
	Traitement 3		
	Traitement 4		
	Date (jour 0):		Entrer la date (jj/mm/aa)
	Date (jour 7):		Entrer la date (jj/mm/aa)
	Date (jour 21):		Entrer la date (jj/mm/aa)

Tableau 2

Feuille de collecte des données brutes pour les jours 7 et 21.

JOUR X
DATE 00/00/00

	Concentration	Numéro du traitement	Numéro du répliquat	Numéro de l'individu	Identifiant de l'individu	Stade de développement	Longueur LMC (mm)	Longueur des pattes postérieures (mm)	Poids du corps humide (mg)
ROW	TRT	TRT	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							
6	0,00	1							
7	0,00	1							
8	0,00	1							

▼**M6**

	Concentration	Numéro du traitement	Numéro du répliquat	Numéro de l'individu	Identifiant de l'individu	Stade de développement	Longueur LMC (mm)	Longueur des pattes postérieures (mm)	Poids du corps humide (mg)
ROW	TRT	TRT	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
9	0,00	1							
10	0,00	1							
11	0,00	1							
12	0,00	1							
13	0,00	1							
14	0,00	1							
15	0,00	1							
16	0,00	1							
17	0,00	1							
18	0,00	1							
19	0,00	1							
20	0,00	1							
21	0,00	2							
22	0,00	2							
23	0,00	2							
24	0,00	2							
25	0,00	2							
26	0,00	2							
27	0,00	2							
28	0,00	2							
29	0,00	2							
30	0,00	2							
31	0,00	2							
32	0,00	2							
33	0,00	2							

▼**M6**

	Concentration	Numéro du traitement	Numéro du répliquat	Numéro de l'individu	Identifiant de l'individu	Stade de développement	Longueur LMC (mm)	Longueur des pattes postérieures (mm)	Poids du corps humide (mg)
ROW	TRT	TRT	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
34	0,00	2							
35	0,00	2							
36	0,00	2							
37	0,00	2							
38	0,00	2							
39	0,00	2							
40	0,00	2							
41	0,00	3							
42	0,00	3							
43	0,00	3							
44	0,00	3							
45	0,00	3							
46	0,00	3							
47	0,00	3							
48	0,00	3							
49	0,00	3							
50	0,00	3							
51	0,00	3							
52	0,00	3							
53	0,00	3							
54	0,00	3							
55	0,00	3							
56	0,00	3							
57	0,00	3							
58	0,00	3							

▼**M6**

	Concentration	Numéro du traitement	Numéro du répliquat	Numéro de l'individu	Identifiant de l'individu	Stade de développement	Longueur LMC (mm)	Longueur des pattes postérieures (mm)	Poids du corps humide (mg)
ROW	TRT	TRT	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
59	0,00	3							
60	0,00	3							
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							
80	0,00	4							

▼**M6**

Tableau 3

Valeurs résumées calculées pour les observations des jours 7 et 21

		Stade de développement			LMC (mm)		Longueur des pattes postérieures (mm)		Poids (mg)	
TRT	REP	MIN	MEDIANE	MAX	MOYEN-NE	ECART TYPE	MOYENNE	ECART TYPE	MOYENNE	ECART TYPE
1	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Note: les calculs effectués sont normalement associés avec les données entrées dans le tableau 2.

Tableau 4

Données de mortalité quotidienne

Jour	Date	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																
1	#Value!																
2	#Value!																
3	#Value!																
4	#Value!																
5	#Value!																

▼**M6**

Jour	Date	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
6	#Value!																
7	#Value!																
8	#Value!																
9	#Value!																
10	#Value!																
11	#Value!																
12	#Value!																
13	#Value!																
14	#Value!																
15	#Value!																
16	#Value!																
17	#Value!																
18	#Value!																
19	#Value!																
20	#Value!																
21	#Value!																
Somme répliquat		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Somme traitement		0				0				0				0			

Note: les calculs effectués sont normalement associés avec les données entrées dans le tableau 1.

Tableau 5

Critères de qualité de l'eau

Système d'exposition (flux continu/renouvellement statique):
Température:
Intensité lumineuse:
Cycle jour-nuit:
Nourriture:
Fréquence de l'alimentaiton:
pH de l'eau:
Concentration d'iode dans la solution d'essai:

▼**M6**

Tableau 6

Résumé des données de chimie.

Nom de la substance chimique																				
# CAS:																				
Jour	Date	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																				
1	#Value!																				
2	#Value!																				
3	#Value!																				
4	#Value!																				
5	#Value!																				
6	#Value!																				
7	#Value!																				
8	#Value!																				
9	#Value!																				
10	#Value!																				
11	#Value!																				
12	#Value!																				
13	#Value!																				
14	#Value!																				
15	#Value!																				
16	#Value!																				
17	#Value!																				
18	#Value!																				
19	#Value!																				
20	#Value!																				
21	#Value!																				

Note: les calculs effectués sont normalement associés avec les données entrées dans le tableau 1.

▼**M6**

Tableau 7

Tableau de rapport des critères essentiels utilisés en histopathologie

Date: Substance chimique: Pathologiste:

ID Animal témoin — répliquat 1		Hypertrophie de la glande thyroïde	Atrophie de la glande thyroïde	Hypertrophie des cellules folliculaires	Hyperplasie des cellules folliculaires
ID Animal témoin — répliquat 2					
Total:					

Dose Animal ID — répliquat 1		Hypertrophie de la glande thyroïde	Atrophie de la glande thyroïde	Hypertrophie des cellules folliculaires	Hyperplasie des cellules folliculaires
Dose Animal ID — répliquat 2					
Total:					

Dose Animal ID — répliquat 1		Hypertrophie de la glande thyroïde	Atrophie de la glande thyroïde	Hypertrophie des cellules folliculaires	Hyperplasie des cellules folliculaires
Dose Animal ID — répliquat 2					
Total:					

Dose Animal ID — répliquat 1		Hypertrophie de la glande thyroïde	Atrophie de la glande thyroïde	Hypertrophie des cellules folliculaires	Hyperplasie des cellules folliculaires
Dose Animal ID — répliquat 2					
Total:					

▼**M6**

Tableau 8

Critères supplémentaires utilisés en histopathologie

Date: Substance chimique: Pathologiste:

Animal témoin ID — répliquat 1		Augmentation de la surface de la lumière folliculaire	Diminution de la surface de la lumière folliculaire
Animal témoin ID — répliquat 2			
Total:			

Dose Animal ID — répliquat 1		Augmentation de la surface de la lumière folliculaire	Diminution de la surface de la lumière folliculaire
Dose Animal ID — répliquat 2			
Total:			

Dose Animal ID — répliquat 1		Augmentation de la surface de la lumière folliculaire	Diminution de la surface de la lumière folliculaire
Dose Animal ID — répliquat 2			
Total:			

Dose Animal ID — répliquat 1		Augmentation de la surface de la lumière folliculaire	Diminution de la surface de la lumière folliculaire
Dose Animal ID — répliquat 2			
Total:			

▼**M6**

Tableau 9

Description narrative des observations histopathologiques

Date:

Substance chimique:

Pathologiste:

		Description narrative
Animal témoin ID — répliquat 1		
Animal témoin ID — répliquat 2		
Dose Animal ID — répliquat 1		
Dose Animal ID — répliquat 2		

▼**M6**

Dose Animal ID — répliquat 1		
Dose Animal ID — répliquat 2		
Dose Animal ID — répliquat 1		
Dose Animal ID — répliquat 2		

▼M6

Tableau 10

Tableau de rapport des données résumées pour le jour J (7 ou 21) de l'EMA

		Témoin				Traitement 1					Traitement 2					Traitement 3				
Observation	Répliquat	Moyenne	Ec. Type	CV	N	Moyenne	Ec. Type	CV	N	p-value	Moyenne	Ec. Type	CV	N	p-value	Moyenne	Ec. Type	CV	N	p-value
Longueur des pattes postérieures (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Moyenne:																			
LMC (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Moyenne:																			
Poids humide (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Moyenne:																			

▼M6

Tableau 11

Tableau de rapport des données de stade de développement résumées pour le jour J (7 ou 21) de l'EMA.

		Témoin				Traitement 1					Traitement 2					Traitement 3				
	Répliquat	Médiane	Min	Max	N	Médiane	Min	Max	N	p-value	Médiane	Min	Max	N	p-value	Médiane	Min	Max	Médiane	p-value
Stade de développement	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Moyenne:																			

▼**M6**

Appendice 3

Autres méthodes d'analyse du poids et de la longueur dans le cas où un stade de développement avancé concerne plus de 20 % des têtards dans une ou plusieurs concentrations

Si un nombre plus important de têtards se caractérisent par un stade de développement dépassant 60 (≥ 20 %) dans une ou plusieurs concentrations nominales, il convient d'effectuer une ANOVA à deux facteurs intégrant une structure de variance sous-jacente pour évaluer les effets sur la croissance dus aux traitements chimiques sur l'ensemble des individus, tout en prenant en compte l'effet du stade de développement avancé sur la croissance.

Il s'agit là d'exploiter l'intégralité des données, mais de prendre en compte l'effet du stade de développement avancé. À cette fin, il est possible de recourir à une ANOVA à deux facteurs intégrant une structure de variance sous-jacente. Ainsi, le critère Stade avancé = OUI concerne tout animal présentant un stade de développement supérieur ou égal à 61. Dans le cas contraire, le critère est défini par Stade avancé = NON. L'ANOVA à deux facteurs concernant les interactions entre la concentration et le Stage avancé est ainsi rendue possible, avec rep(Conc) comme facteur aléatoire et Têtard(rep) comme effet aléatoire. Cette méthode traite toujours le répliquat comme unité d'analyse, et fournit essentiellement les mêmes résultats qu'une analyse des moyennes rep*Stade avancé, pondérée par le nombre d'animaux par moyenne. Si les données ne répondent pas à l'exigence de normalité et d'homogénéité de la variance posée par une ANOVA, une transformation par rang normalisée peut être effectuée pour résoudre le problème.

En plus du test F classique de l'ANOVA sur les effets des Conc, Stade avancé et leurs interactions, le test F d'interaction peut être scindé en deux tests F d'ANOVA, l'un d'entre eux traitant les réponses moyennes obtenues sur l'ensemble des concentrations avec le critère Stade avancé = NON, tandis que le second se fonde sur les réponses moyennes relevées pour toutes les concentrations correspondant à Stade avancé = OUI. De plus amples comparaisons entre les moyennes des divers traitements par rapport au témoin sont menées au sein de chaque groupe défini par le critère Stade avancé. Une analyse tendancielle peut être effectuée en employant les contrastes appropriés ou une simple comparaison par paires, si la fonction dose-réponse se révèle non monotone chez un des groupes caractérisés par le critère Stade avancé. Une correction des p-valeurs selon Bonferroni — Holm n'est requise que lorsque la partie du test F correspondante n'est pas significative. Ces opérations sont prises en charge par SAS, et probablement d'autres logiciels statistiques. Des complications peuvent survenir si certaines concentrations ne comptent aucun animal présentant un stade de développement avancé, cependant ces situations peuvent être résolues simplement.

▼**M6**

Appendice 4

Définitions

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼M6

C.39. ESSAI DE REPRODUCTION DE COLLEMBOLES DANS LE SOL

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 232 (2009) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La présente méthode d'essai est destinée à évaluer les effets des substances chimiques sur la reproduction des collemboles dans le sol. Elle est fondée sur les procédures existantes (1) (2). *Folsomia candida*, qui se reproduit par parthénogénèse, et *Folsomia fimetaria*, dont la reproduction est sexuée, sont deux des espèces de collemboles les plus répandues, qu'il est possible d'élever et qui sont disponibles dans le commerce. Lorsque des habitats spécifiques où ni l'une ni l'autre de ces espèces ne sont présentes sont évalués, la procédure peut également être étendue à d'autres espèces de collemboles dès lors qu'elles peuvent satisfaire aux critères de validité de l'essai.

2. Les collemboles, qui peuplent les sols, sont des espèces écologiquement pertinentes pour les essais d'écotoxicité. Les collemboles sont des hexapodes possédant un exosquelette extrêmement perméable à l'air et à l'eau, et constituent des espèces d'arthropodes caractérisées par une autre voie et un autre taux d'exposition que les vers de terre et les enchytréides.

3. Les densités des populations de collemboles atteignent communément 10^5 m^{-2} dans le sol et la litière feuillue dans beaucoup d'écosystèmes terrestres (3) (4). Les adultes mesurent généralement de 0,5 à 5 mm et leur contribution à la biomasse animale totale présente dans le sol et à la respiration totale du sol se situe d'après les estimations dans une fourchette de 1 % à 5 % (5). Ils pourraient donc jouer principalement le rôle de régulateurs potentiels des processus écologiques en s'alimentant de microorganismes comme au travers de la prédation de la microfaune. Les collemboles sont les prédateurs d'un vaste éventail d'invertébrés endogés et épigés, tels que les acariens, les millepattes, les araignées, les coléoptères carabidés et les staphylins. Les collemboles contribuent aux processus de décomposition dans les sols acides où ils peuvent être, avec les enchytréides, les principaux invertébrés présents dans le sol, puisque les vers de terre et les diplopodes en sont généralement absents.

4. *F. fimetaria* a une répartition mondiale et est commun dans plusieurs types de sols, depuis les sols sableux jusqu'aux sols limoneux et depuis les mulls jusqu'aux mors. C'est un collembole dépourvu d'yeux et de pigmentation. Il a été observé dans les sols agricoles de toute l'Europe (6). Il a un régime alimentaire omnivore composé de filaments de mycélium, de bactéries, de protozoaires et de détritus. Il interagit au travers du broutage avec les infections imputables aux champignons pathogènes des végétaux (7) et pourrait exercer une influence sur les mycorhizes, à l'instar de F. candida, dont on sait que tel est le cas. Comme la plupart des espèces de collemboles, il se reproduit sexuellement, aussi la présence permanente de mâles est-elle indispensable pour la fécondation des œufs.

5. *F. candida* a également une répartition mondiale. Bien qu'il soit commun dans la plupart des sols naturels, on le rencontre souvent en de très nombreux endroits riches en humus. C'est un collembole dépourvu d'yeux et de pigmentation. Doté d'une furca (organe de saut) bien développée, il court vivement et s'empresse de bondir s'il est dérangé. Le rôle écologique de *F. candida* est similaire à celui de *F. fimetaria*, mais ses habitats sont constitués de sols organiques plus riches. Il se reproduit par parthénogénèse. La proportion de mâles peut être inférieure à 1 pour mille.

PRINCIPE DE L'ESSAI

6. Des collemboles synchrones, adultes (F. fimetaria) ou juvéniles (F. candida), sont exposés à une gamme de concentrations de la substance chimique d'essai mélangée à un sol artificiel modifié (8) comportant une teneur en matières organiques de 5 % (ou à un sol de remplacement). On peut distinguer deux étapes dans la procédure d'essai:

   — un essai préliminaire de détermination des concentrations, si des informations sur la toxicité manquent, dans lequel la mortalité et la reproduction

▼M6

sont les principaux paramètres évalués après 2 semaines pour *F. fimetaria* et 3 semaines pour *F. candida*

— l'essai de reproduction proprement dit dans lequel on évalue le nombre total de juvéniles produits par animal parent et la survie des animaux parents. La durée de l'essai proprement dit est de 3 semaines pour *F. fimetaria* ou de 4 semaines pour *F. candida*.

L'effet toxique de la substance chimique d'essai sur la mortalité et le taux de reproduction des adultes est mesuré par les valeurs CL_x et CE_x, les données étant ajustées à un modèle approprié au moyen d'une régression non linéaire en vue d'estimer la concentration qui entraînerait x % de mortalité ou de réduction du taux de reproduction, respectivement, ou encore par celle de la CSEO/CMEO (9).

INFORMATION SUR LA SUBSTANCE CHIMIQUE D'ESSAI

7. Il est préférable de connaître les propriétés physiques, l'hydrosolubilité, le log K_{oe}, le coefficient de partage entre l'eau et le sol et la pression de vapeur de la substance chimique d'essai. Des informations supplémentaires sur le devenir de la substance d'essai dans le sol, notamment sa vitesse de photolyse, d'hydrolyse et de dégradation biotique, seraient souhaitables. L'identification chimique de la substance d'essai selon la nomenclature de l'IUPAC, le numéro CAS, le lot de fabrication, le lot de conditionnement, la formule structurale et le degré de pureté devraient également être consignés si ces informations sont disponibles.

8. La présente méthode d'essai convient à l'essai de substances chimiques hydrosolubles ou insolubles; néanmoins, le mode d'application de la substance d'essai variera en conséquence. Cette méthode d'essai n'est pas applicable aux substances volatiles, c'est-à-dire aux substances chimiques pour lesquelles la constante de Henry ou le coefficient de partage air/eau est supérieur à un, ou celles pour lesquelles la pression de vapeur dépasse 0,0133 Pa à 25 °C.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

9. Les témoins non traités devraient satisfaire aux critères suivants pour que le résultat de l'essai soit considéré comme valide:

— la mortalité moyenne des adultes n'excède pas 20 % à la fin de l'essai;

— le nombre moyen de juvéniles par récipient est au moins égal à 100 à la fin de l'essai;

— le coefficient de variation calculé pour le nombre de juvéniles est inférieur à 30 % à la fin de l'essai proprement dit.

SUBSTANCE CHIMIQUE DE RÉFÉRENCE

10. Une substance chimique de référence est testée à sa concentration efficace à 50 % (CE_{50}) pour le type de sol d'essai choisi, soit à intervalles réguliers, soit dans tous les essais, afin de vérifier que la réponse des organismes d'essai dans le système expérimental demeure de niveau normal. L'acide borique, qui devrait réduire de 50 % la reproduction de l'une et l'autre espèces (10) (11) à environ 100 mg/kg de sol en poids sec, est une substance de référence appropriée.

DESCRIPTION DE L'ESSAI

Récipients expérimentaux et matériel

11. Les récipients expérimentaux peuvent contenir 30 g de sol humide. Le matériau est constitué de verre ou de plastique inerte (non toxique). Cependant, l'utilisation de récipients en plastique est évitée si l'exposition à la substance chimique d'essai est diminuée du fait de la sorption. Les récipients expérimentaux ont une surface horizontale telle qu'ils puissent contenir des

▼M6

échantillons de sol d'une profondeur effective de 2 à 4 cm. Les récipients sont munis de couvercles (en verre ou en polyéthylène, par exemple) afin de réduire l'évaporation de l'eau, tout en autorisant les échanges gazeux entre le sol et l'atmosphère. Les récipients sont au moins partiellement transparents afin de permettre le passage de la lumière.

12. Cet essai requiert du matériel de laboratoire courant, en particulier:

— armoire à séchage;

— stéréomicroscope;

— pH-mètre et luxmètre;

— balances suffisamment précises;

— instruments appropriés permettant de réguler la température;

— instruments permettant de contrôler l'humidité de l'air (facultatifs si les récipients expérimentaux sont fermés par des couvercles);

— incubateur ou petite chambre à température contrôlée;

— pinces ou appareil d'aspiration de faible puissance.

Préparation du sol d'essai

13. Un sol artificiel modifié (8) contenant 5 % de matière organique est utilisé pour l'essai. Un sol naturel peut également être utilisé, étant donné que le sol artificiel ne ressemble pas aux sols naturels. La composition recommandée du sol artificiel est la suivante (en poids secs, séchés à 105 °C jusqu'à obtention d'un poids constant):

— 5 % de tourbe à sphaigne, séchée à l'air et finement broyée (une dimension des particules de 2 +/– 1 mm est acceptable);

— 20 % d'argile kaolinique (taux de kaolinite de préférence supérieur à 30 %);

— environ 74 % de sable industriel séché à l'air (selon la quantité de $CaCO_3$ nécessaire), essentiellement du sable fin contenant plus de 50 % de particules mesurant entre 50 et 200 microns. La quantité exacte de sable dépend de la quantité de $CaCO_3$ (voir ci-dessous), la part conjointe de ces deux éléments devant atteindre 75 %;

— 1,0 % de carbonate de calcium ($CaCO_3$, pulvérisé, qualité analytique) afin d'obtenir un pH de 6,0 ± 0,5; la quantité de carbonate de calcium à ajouter dépend principalement de la qualité et de la nature de la tourbe (voir note 1).

Note 1: La quantité de $CaCO_3$ requise dépend des composants du substrat de sol et est déterminée par mesure du pH des sous-échantillons de sol humide préincubé immédiatement avant l'essai.

Note 2: Il est recommandé de mesurer le pH et de manière facultative le rapport C/N, la capacité d'échange de cations (CEC) et la teneur en matières organiques du sol en vue de permettre une normalisation ultérieure et une meilleure interprétation des résultats.

Note 3: Si besoin est, par exemple à des fins d'essai spécifiques, des sols naturels provenant de sites non pollués peuvent également servir de substrat d'essai et/ou de culture. Toutefois, lorsque l'on utilise un sol naturel, il faut le caractériser au moins par son origine (site de récolte), son pH, sa texture (distribution de tailles de particules) sa CEC et sa teneur en matières organiques, et il doit être exempt de toute contamination. Pour ce qui est des sols naturels, il convient de démontrer qu'ils sont adaptés à la réalisation d'un essai et qu'ils permettent de répondre aux critères de validité de l'essai.

▼M6

14. Les constituants secs du sol sont soigneusement mélangés (par exemple, dans un grand mélangeur de laboratoire). La capacité de rétention d'eau (CRE) maximale du sol artificiel est déterminée conformément aux protocoles décrits dans l'Appendice 5. La teneur en humidité du sol d'essai est optimisée de sorte à lui donner une structure meuble et poreuse qui permette aux collemboles de pénétrer dans les pores. Tel est généralement le cas entre 40 et 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau.

15. Le sol artificiel sec est préhumidifié par l'ajout d'une quantité suffisante d'eau désionisée pour atteindre environ la moitié de sa teneur en eau finale 2 à 7 jours avant le début de l'essai, pour que l'acidité s'équilibre/se stabilise. Le pH est déterminé avec un mélange de sol et d'une solution de chlorure de potassium (KCl) 1 M ou de chlorure de calcium (CaCb) 0,01 M dans un rapport 1/5 (voir Appendice 6). Si l'acidité du sol est supérieure à la limite requise, elle peut être ajustée par addition d'une quantité appropriée de $CaCO_3$. Si le sol est trop alcalin, il peut être rééquilibré par l'ajout d'un acide inorganique sans danger pour les collemboles.

16. Le sol préhumidifié est divisé en autant de portions que de concentrations expérimentales, de témoins et de substances chimiques de référence utilisés dans l'essai. Les substances chimiques d'essai sont ajoutées et la teneur en eau est régulée comme indiqué au paragraphe 24.

Sélection et préparation des animaux d'essai

17. *F. candida*, qui est parthénogénétique, est l'espèce recommandée parce que dans l'essai circulaire de la méthode d'essai (11), le critère de validité relatif à la survie a été rempli plus souvent avec cette espèce qu'avec *F. fimetaria*. Si une espèce alternative est utilisée, il faut qu'elle remplisse les critères de validité mentionnés au paragraphe 9. Au début de l'essai les animaux sont bien nourris et âgés de 23 à 26 jours dans le cas de *F. fimetaria* et de 9 à 12 jours dans celui de *F. candida*. Pour chaque expérience identique, le nombre de *F. fimetaria* est de 10 mâles et 10 femelles, et pour ce qui est de *F. candida* 10 femelles sont utilisées (voir Appendices 2 et 3). Pour chacun des lots ajoutés à une expérience identique, les animaux synchrones sont tirés au hasard des récipients et leur état de santé et leur condition physique sont contrôlés. Chaque groupe de 10/20 individus est ajouté à un récipient d'essai choisi au hasard et de grosses femelles de *F. fimetaria* sont sélectionnées de sorte qu'elles puissent être aisément distinguées des *F. fimetaria* mâles.

Préparation des concentrations expérimentales

18. Quatre méthodes d'application de la substance chimique d'essai peuvent être utilisées: 1) mélanger la substance d'essai au sol en utilisant de l'eau en guise de support, 2) mélanger la substance d'essai au sol en utilisant un solvant organique en guise de support, 3) mélanger la substance d'essai au sol en utilisant du sable en guise de support, ou 4) appliquer la substance d'essai à la surface du sol. Le choix de la méthode appropriée dépend des caractéristiques de la substance d'essai et de la finalité de l'essai. On recommande, en général, de mélanger la substance chimique d'essai au sol. Des modes d'application conformes à l'utilisation concrète de la substance d'essai pourraient cependant s'imposer (par exemple, la pulvérisation de préparations liquides ou l'utilisation de présentations spéciales de pesticides telles que les granulés ou les produits de traitement des semences). Le sol est traité avant l'ajout des collemboles, qu'il convient de laisser s'enfoncer dans le sol, sauf si la substance d'essai est appliquée à la surface de celui-ci.

Substance chimique d'essai hydrosoluble

19. Une solution de la substance chimique d'essai dans de l'eau désionisée est préparée en une quantité suffisante pour toutes les expériences identiques d'une concentration expérimentale. Chaque solution de la substance d'essai est soigneusement mélangée à un lot du sol préhumidifié, avant d'être introduite dans le récipient expérimental.

Substance chimique d'essai insoluble dans l'eau

20. Les substances chimiques non solubles dans l'eau mais solubles dans des solvants organiques peuvent être dissoutes dans le plus petit volume possible

▼M6

d'un solvant approprié (par exemple de l'acétone) permettant néanmoins un bon mélange de la substance chimique dans le sol ainsi que son mélange avec une partie du sable quartzique requis. Seuls des solvants volatils peuvent être utilisés. Lorsqu'un solvant organique est utilisé, toutes les concentrations expérimentales et un témoin négatif de solvant supplémentaire contiennent la même quantité minimale de solvant. Les récipients où est effectuée l'application sont laissés sans couvercle pendant un certain temps afin de permettre au solvant associé à l'application de la substance d'essai de s'évaporer, en veillant à ce qu'aucune dissipation de la substance toxique ne se produise pendant ce temps.

Substance chimique d'essai peu soluble dans l'eau et les solvants organiques

21. Pour les substances chimiques peu solubles dans l'eau et les solvants organiques, on mélange du sable quartzique, qui doit faire partie du volume total de sable ajouté au sol, à la quantité de substance d'essai nécessaire pour obtenir la concentration expérimentale voulue. Ce mélange de sable quartzique et de la substance d'essai est ajouté au sol préhumidifié, auquel il est soigneusement mélangé après l'ajout de la quantité d'eau désionisée nécessaire pour atteindre l'humidité requise. Le mélange final est réparti entre les récipients expérimentaux. On répète la procédure pour chaque concentration expérimentale et on prépare un témoin approprié.

Application de la substance chimique d'essai à la surface du sol

22. Si la substance d'essai est un pesticide, il peut être pertinent de l'appliquer à la surface du sol par pulvérisation. Le sol est traité après l'ajout des collemboles. Les récipients expérimentaux sont d'abord remplis avec le substrat de sol humidifié, puis les animaux sont ajoutés et les récipients expérimentaux sont ensuite pesés. Afin d'éviter toute exposition directe des animaux par contact direct avec la substance d'essai, celle-ci est appliquée au moins une demi-heure après l'introduction des collemboles. La substance chimique d'essai devrait être répartie à la surface du sol de façon aussi régulière que possible, à l'aide d'un épandeur de laboratoire apte à simuler la pulvérisation sur un champ. L'application devrait avoir lieu à une température de ± 2 °C et, s'agissant de solutions aqueuses, d'émulsions ou de dispersions à une densité conforme aux recommandations d'évaluation des risques. Il convient de vérifier le taux à l'aide d'une technique d'étalonnage appropriée. L'application des présentations spéciales, telles que les granulés ou les produits de traitement des semences, pourrait reproduire leur mode d'emploi en agriculture. La nourriture est ajoutée après la pulvérisation.

MODE OPÉRATOIRE

Conditions expérimentales

23. L'essai est conduit à une température moyenne de 20 ± 1 °C, dans une fourchette de températures de 20 ± 2 °C. L'essai est mené sous des cycles réglés de lumière et d'obscurité (de préférence 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité), avec un éclairement de 400 à 800 lux dans la zone des récipients expérimentaux.

24. Pour vérifier l'humidité du sol, on pèse les récipients au début, au milieu et à la fin de l'essai. Toute perte de poids > 2 % est compensée par l'ajout d'eau désionisée. Remarquons que la perte d'eau peut être réduite par le maintien d'un taux d'humidité de l'air élevé (> 80 %) dans l'incubateur.

25. Le pH est mesuré au début et à la fin de l'essai préliminaire de détermination des concentrations et de l'essai proprement dit. Des mesures devraient être effectuées sur un échantillon supplémentaire témoin et un échantillon supplémentaire de sol traité (à toutes les concentrations), préparés et entretenus de la même manière que les cultures expérimentales, mais sans ajout des collemboles.

Procédure d'essai et mesures

26. Pour chaque concentration expérimentale, une quantité de sol d'essai correspondant à 30 g de poids frais est placée à l'intérieur du récipient expérimental. On prépare également des témoins d'eau sans substance d'essai. Si la

▼M6

substance d'essai est appliquée à l'aide d'un véhicule, une série de témoins contenant uniquement le véhicule devrait être mis à l'essai parallèlement à la série traitée avec la substance d'essai. La concentration du solvant ou du dispersant devrait être identique à celle utilisée dans les récipients expérimentaux contenant la substance d'essai.

27. Les collemboles sont transférés avec soin dans les différents récipients expérimentaux (entre lesquels ils sont répartis aléatoirement) et placés à la surface du sol. Pour assurer un transfert efficace des animaux, un appareil d'aspiration de faible puissance peut être utilisé. Le nombre d'expériences identiques pour les concentrations expérimentales et les témoins dépend de la conception de l'essai. Les récipients expérimentaux sont placés au hasard dans l'incubateur et leurs emplacements sont modifiés au hasard chaque semaine.

28. Pour l'essai avec *F. fimetaria*, 20 adultes, 10 mâles et 10 femelles, âgés de 23 à 26 jours sont utilisés par récipient expérimental. Au 21ème jour, les collemboles sont extraits du sol et comptés. Dans le cas de *F. fimetaria*, le sexe des animaux synchronisés composant le lot utilisé pour l'essai est déterminé en fonction de leur taille. Les femelles sont en effet nettement plus grosses que les mâles (Voir Appendice 3).

29. Pour l'essai avec *F. candida*, 10 juvéniles de 9 à 12 jours par récipient expérimental sont utilisés. Au 28ème jour, les collemboles sont extraits du sol et comptés.

30. Une source de nourriture appropriée constituée d'une quantité suffisante, de 2 à 10 mg par exemple, de levure de boulanger sèche en granulés, disponible dans le commerce pour un usage ménager, est ajoutée à chaque récipient au début de l'essai puis après 2 semaines environ.

31. À la fin de l'essai, la mortalité et la reproduction sont évaluées. Après 3 semaines (*F. fimetaria*) ou 4 semaines (*F. candida*), les collemboles sont extraits du sol d'essai (voir Appendice 4) et comptés (12). Un collembole est consigné comme mort s'il n'est pas présent lors de l'extraction. La méthode d'extraction et de comptage est validée. Sa validité implique une efficacité d'extraction des juvéniles supérieures à 95 %, et peut par exemple être vérifiée par l'ajout d'un nombre connu d'individus au sol.

32. Le déroulement concret de la procédure d'essai et son calendrier sont décrits dans l'Appendice 2.

Plan de l'essai

Essai préliminaire de détermination des concentrations

33. Si nécessaire, un essai préliminaire de détermination des concentrations est mené avec, par exemple, cinq concentrations expérimentales: 0,1, 1,0, 10, 100 et 1 000 mg/kg de masse sèche de sol. Deux expériences identiques par concentration et par témoin sont par ailleurs effectuées. Des informations supplémentaires, provenant d'essais avec des substances chimiques similaires ou tirées d'études déjà publiées, sur la mortalité ou la reproduction des collemboles peuvent également être utiles pour décider de la gamme de concentrations à utiliser dans l'essai préliminaire de détermination des concentrations.

34. La durée de l'essai préliminaire de détermination des concentrations est de deux semaines pour *F. fimetaria* et de 3 semaines pour *F. candida* afin de garantir que des juvéniles auront été produits. À la fin de l'essai, la mortalité et la reproduction des collemboles sont évaluées. Le nombre d'adultes et celui de juvéniles sont consignés.

Essai proprement dit

35. Pour déterminer la CE_x (par exemple CE_{10}, CE_{50}), il faut tester douze concentrations. Au minimum deux expériences identiques par concentration d'essai plus six témoins identiques sont recommandés. Le facteur d'espacement peut varier en fonction de la relation dose-réponse.

▼M6

36. Pour déterminer la CSEO/CMEO, il faut tester au moins cinq concentrations formant une série géométrique. Quatre expériences identiques par concentration d'essai plus huit témoins sont recommandées. Les concentrations sont espacées d'un facteur d'au plus 1,8.

37. Une démarche combinée permet de déterminer à la fois la CSEO/CMEO et la CE_x. On utilise à cet effet huit concentrations formant une série géométrique. Quatre expériences identiques par concentration d'essai plus huit témoins sont recommandées. Les concentrations sont espacées d'un facteur d'au plus 1,8.

38. Si aucun effet n'est observé à la plus forte concentration lors de l'essai préliminaire de détermination des concentrations (1 000 mg/kg), l'essai de reproduction peut devoir être conduit comme un essai limite, avec une concentration expérimentale de 1 000 mg/kg plus le témoin. Un essai limite permettra de démontrer l'absence d'effet statistiquement significatif à la concentration limite. Il faut alors utiliser huit expériences identiques pour le sol traité et pour le témoin.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

39. Le taux de reproduction est le principal paramètre à évaluer (par exemple le nombre de juvéniles produits par récipient expérimental). L'analyse statistique, à l'aide par exemple des procédures d'analyse de la variance (ANOVA), compare les différentes concentrations au moyen du test t de Student, du test de Dunnett, ou du test de Williams. Les intervalles de confiance à 95 % sont calculés pour les moyennes établies aux différentes concentrations.

40. Le nombre d'adultes survivants dans les témoins non traités est un critère de validité essentiel qui est détaillé. Comme dans l'essai préliminaire de détermination des concentrations, tous les autres signes de nocivité sont également consignés dans le rapport final.

CL_x et CE_x

41. On calcule les valeurs de CE_x et leurs limites de confiance à 95 % supérieures et inférieures correspondant au paramètre, en utilisant des méthodes statistiques adéquates (fonction logistique ou de Weibull, méthode abrégée de Spearman-Karber, ou interpolation simple, par exemple). Une CE_x est obtenue en intégrant une valeur correspondant à x % de la moyenne du témoin dans l'équation retenue. Pour calculer la CE_{50} ou toute autre CE_x, la série de données complète est soumise à une analyse de régression. La CL_{50} est généralement estimée par analyse des probits ou par des méthodes d'analyse similaires prenant en compte les données sur la mortalité, qui suivent une distribution binomiale.

CSEO/CMEO

42. Lorsqu'une analyse statistique est appliquée pour déterminer la CSEO ou la CMEO, il faut disposer de statistiques par récipient (chaque récipient individuel étant considéré comme une expérience distincte). Il convient alors d'utiliser des méthodes statistiques adéquates conformément au Document 54 de l'OCDE intitulé Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application (9). En général, les effets indésirables de la substance chimique d'essai par rapport au témoin sont étudiés en procédant à une vérification de l'hypothèse unilatérale (plus faible) pour $p \leq 0{,}05$.

43. La distribution normale et l'homogénéité de la variance peuvent être vérifiées à l'aide d'un test statistique approprié, tel que le test de Shapiro-Wilk et le test de Levene, respectivement ($p \leq 0{,}05$). Une analyse de la variance à un facteur (ANOVA), puis des tests multi-comparaisons peuvent être effectués.

▼M6

Des tests de comparaisons multiples (test de Dunnett, par exemple) ou des tests d'analyse de tendance descendante (tel que le test de William) peuvent permettre de calculer d'éventuelles différences significatives ($p \leq 0,05$) entre les témoins et les diverses concentrations de substance chimique d'essai [on choisira le test recommandé conformément au Document 54 de l'OCDE (9)]. On peut toutefois utiliser des méthodes non paramétriques (tels que le test U de Bonferroni conformément à Holm ou le test de tendance de Jonckheere-Terpstra) pour déterminer la CSEO et la CMEO.

Essai limite

44. Si un essai limite a été mis en œuvre (comparaison du témoin et d'un seul traitement) et que les conditions requises pour les procédures de tests paramétriques (normalité, homogénéité) sont remplies, on peut évaluer les réponses métriques par le test de Student (test t). Le test t de variance inégale (test t de Welch) ou bien un test non paramétrique tel que le test U de Mann-Whitney peuvent être employés lorsque ces conditions ne sont pas satisfaites.

45. Si l'on cherche à déterminer des différences significatives entre les témoins (témoin et témoin de solvant), les répliques de chaque témoin peuvent être testées comme décrit pour l'essai limite. Lorsque les essais ne détectent aucune différence significative, il est possible de rassembler toutes les expériences identiques témoins et témoins de solvant. Dans le cas contraire, il faut comparer tous les traitements avec le témoin de solvant.

Rapport d'essai

46. Le rapport d'essai comprend au moins les informations suivantes:

Substance chimique d'essai

— identité de la substance d'essai, lot de fabrication, lot de conditionnement et numéros CAS, degré de pureté;

— propriétés physico-chimiques de la substance d'essai (par exemple log Koe, hydrosolubilité, pression de vapeur, constante de Henry (H) et, de préférence, information sur le devenir de la substance d'essai dans le sol) si elles sont connues;

— formulation de la substance d'essai et nature des additifs si ce n'est pas le produit chimique pur qui est testé;

Organisme d'essai

— identification des espèces et fournisseur des organismes d'essai, description des conditions d'élevage et fourchettes d'âges des organismes d'essai;

Conditions expérimentales

— description du plan de l'étude et du mode opératoire;

— détails sur la préparation du sol d'essai; description détaillée lorsque l'on utilise un sol naturel (origine, histoire, distribution de tailles de particules, pH, teneur en matières organiques);

— capacité de rétention d'eau du sol;

— description de la méthode d'application de la substance chimique d'essai dans le sol;

— conditions expérimentales intensité lumineuse, durée des cycles de lumière et d'obscurité, température;

— description du régime d'administration de la nourriture, nature et quantité de nourriture fournie au cours de l'essai, dates d'alimentation;

— pH et teneur en eau du sol au début et à la fin de l'essai (pour le témoin et chacune des concentrations);

— description détaillée de la méthode d'extraction et de l'efficacité d'extraction;

▼M6

Résultats de l'essai

— nombre de juvéniles déterminés dans chaque récipient expérimental à la fin de l'essai;

— nombre et mortalité des adultes (%) dans chaque récipient expérimental à la fin de l'essai;

— description des effets physiologiques évidents ou des symptômes pathologiques ou des changements nets de comportement;

— résultats obtenus avec la substance chimique d'essai de référence;

— valeurs de la CSEO/CMEO, des CL_x pour la mortalité et des CE_x pour la reproduction (principalement les CL_{50}, CL_{10}, CE_{50} et CE_{10}) et intervalles de confiance à 95 % Graphique du modèle ajusté utilisé pour effectuer le calcul, équation de la fonction correspondante, ainsi que ses paramètres (9);

— toutes les informations et observations utiles à l'interprétation des résultats;

— puissance du test effectivement réalisé s'il est procédé à une vérification de l'hypothèse formulée (9);

— écarts par rapport aux procédures décrites dans la présente méthode d'essai et faits inhabituels survenus au cours de l'essai;

— validité de l'essai;

— en cas d'estimation de la CSEO, différence minimale détectable.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Wiles JA and Krogh PH (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (dir. de pub. H Løkke et CAM Van Gestel), pp. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.

(2) ISO (1999) Soil Quality — Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. N° 11267. Organisation internationale de normalisation, Genève.

(3) Burges A et Raw F (Eds) (1967) Soil Biology. Academic Press. Londres.

(4) Petersen H et Luxton M (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388.

(5) Petersen H (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. Acta Zoologica Fennica 195: 111-118.

(6) Hopkin SP (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. 330pp (ISBN 0-19-854084-1)

(7) Ulber B (1983) Einfluss von *Onychirurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In New trends in soil Biology (Lebrun Ph, André HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (dir. de pub.), Actes du VIème colloque international sur la zoologie du sol, Louvain-la-neuve (Belgique), 30 août — 2 septembre 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, pp. 261-268.

(8) Chapitre C.36 de la présente annexe, *Essai de reproduction d'un acarien prédateur [Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer] dans le sol*

(9) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. A guidance to application, Série de l'OCDE sur les essais et évaluations, Numéro 54, ENV/JM/MONO(2006) 18, OCDE, Paris

(10) Scott-Fordsmand JJ et Krogh PH (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen 61 pp. Ministère danois de l'environnement.

▼**M6**

(11) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Agence danoise pour la protection de l'environnement, Environmental Project No. 1256, pp. 66.

(12) Krogh PH, Johansen K and Holmstrup M (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. Appl. Soil Ecol. 7, 201-205.

(13) Fjellberg A (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.

(14) Edwards C.A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In Soil Zoology (Kevan D.K. McE., Ed). Butterworths, Londres, pp. 412416.

(15) Goto HE (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a note on the use of a fungistatic substance in the cultures. Entomologists' Monthly Magazine 96:138-140.

▼**M6**

Appendice 1

Définitions

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente méthode d'essai (dans cet essai, toutes les concentrations efficaces sont exprimées en masse de la substance chimique d'essai rapportée à la masse sèche du sol d'essai):

Substance chimique: une substance ou un mélange

CSEO (concentration sans effet observé): la concentration de la substance chimique d'essai à laquelle aucun effet n'est observé. Dans cet essai, la concentration correspondant à la CSEO n'a pas d'effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) durant une période d'exposition donnée, en comparaison avec le témoin.

CMEO (concentration minimale avec effet observé): la plus faible concentration de la substance chimique d'essai qui exerce un effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) durant une période d'exposition donnée, en comparaison avec le témoin.

CE_x (concentration efficace à x %): concentration qui engendre un effet de x % sur les organismes d'expérience durant une période d'exposition déterminée, en comparaison avec un témoin. Par exemple, une CE_{50} est une concentration estimée produire un effet sur un paramètre évalué de l'essai dans 50 % d'une population exposée durant une période d'exposition déterminée.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼**M6**

Appendice 2

Principales actions et calendrier de réalisation d'un essai sur les collemboles

Les étapes de l'essai peuvent se résumer comme suit:

Date (jour)	Action
– 23 à – 26.	Préparation d'une culture synchrone de *F. fimetaria*
– 14	Préparer le sol artificiel (mélanger les ingrédients secs) Vérifier le pH du sol artificiel et l'ajuster en conséquence Mesurer la capacité de rétention d'eau maximale du sol
– 9 à – 12.	Préparation d'une culture synchrone de F. candida
– 2 à – 7	Sol préhumidifié
– 1	Répartir les juvéniles en lots Préparer les solutions mères et appliquer la substance chimique d'essai si un solvant est requis
0	Préparer les solutions mères et appliquer la substance chimique d'essai si l'application d'une substance chimique solide ou hydrosoluble est requise, ou qu'elle est effectuée en surface. Mesurer le pH du sol et peser les récipients. Ajouter la nourriture. Introduire les collemboles.
14	Essai préliminaire de détermination des concentrations pour F. fimetaria: mettre un terme à l'essai, extraire les animaux, mesurer le pH du sol et la perte d'eau (poids) Essais proprement dits: mesurer la teneur en humidité et compenser les pertes d'eau, et ajouter de 2 à 10 mg de levure
21	Essai proprement dit pour F. fimetaria: mettre un terme à l'essai, extraire les animaux, mesurer le pH du sol et la perte d'eau (poids) Essai préliminaire de détermination des concentrations pour F. candida: mettre un terme à l'essai, extraire les animaux, mesurer le pH du sol et la perte d'eau (poids)
28	Essai proprement dit pour *F. candida*: mettre un terme à l'essai, extraire les animaux, mesurer le pH du sol et la perte d'eau (poids)

▼M6

Appendice 3

Recommandations en matière d'élevage et de synchronisation de *F. fimetaria* et *F. candida*

Les indications de dates et de durées données dans les présentes recommandations sont vérifiées pour chaque variété particulière de collemboles afin de s'assurer que le calendrier prévu permettra de disposer d'une quantité suffisante de juvéniles synchronisés. Pour l'essentiel, ce sont la survenue de la ponte après le transfert des adultes à un substrat frais et l'éclosion des œufs qui déterminent le jour approprié pour la collecte des œufs et pour celle des juvéniles synchrones.

Il convient de disposer en permanence d'une culture mère composée par exemple de 50 récipients/boîtes de Petri. Cette culture mère devrait être maintenue dans de bonnes conditions d'alimentation en lui fournissant de la nourriture et de l'eau toutes les semaines, et en en retirant la nourriture ancienne et les cadavres. Si le nombre de collemboles présents sur le substrat est trop faible, il peut s'ensuivre une inhibition en raison d'une plus grande formation de moisissures. Si la culture mère est utilisée trop souvent pour la production d'œufs, elle risque de s'épuiser. Les signes d'épuisement prennent la forme de la présence d'adultes morts et de moisissures sur le substrat. Les œufs restant après la production d'animaux synchrones peuvent être utilisés pour rajeunir la culture.

Dans une culture synchrone de *F. fimetaria*, les mâles se distinguent principalement des femelles par la taille. Les mâles sont en effet nettement plus petits que les femelles, et ils se caractérisent par une plus grande vitesse de déplacement qu'elles. La bonne détermination des sexes n'exige guère d'expérience et elle peut être confirmée par inspection de la zone génitale au microscope (13).

1. **Élevage**

1.a. *Préparation du substrat de culture*

Le substrat de culture est constitué de plâtre de Paris (sulfate de calcium) et de charbon de bois actif. On obtient ainsi un substrat humide, la fonction du charbon étant d'absorber les effluents gazeux et les excrétions (14) (15). Différentes formes de charbon peuvent être utilisées pour faciliter l'observation des collemboles. Du charbon de bois en poudre est ainsi utilisé pour *F. candida* et *F. fimetaria* (donnant une coloration gris-noir au plâtre de Paris):

Composition du substrat:

— 20 ml de charbon de bois actif

— 200 ml d'eau distillée

— 200 ml de plâtre de Paris

ou

— 50 g de charbon de bois actif réduit en poudre

— 260-300 ml d'eau distillée

— 400 g de plâtre de Paris.

On laisse reposer le mélange du substrat avant son utilisation.

1.b. *Reproduction*

Les collemboles sont maintenus dans des récipients tels que des boîtes de Petri (90 mm × 13 mm), dont le fond est couvert d'une couche de 0,5 cm de substrat formé de plâtre et de charbon de bois. Ils sont cultivés à une température de 20 ± 1 °C et sous des cycles de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité (avec un éclairement de 400 à 800 lux). Les récipients sont maintenus humides en permanence de sorte que l'humidité relative de l'air y atteigne 100 %. Cela peut être obtenu en assurant la présence d'eau libre dans le plâtre poreux mais en évitant qu'une pellicule

▼M6

d'eau se forme à la surface du plâtre. La perte d'eau peut être évitée en maintenant l'humidité de l'air ambiant. Tous les individus morts devraient être retirés des récipients, de même que toute nourriture moisie. Pour stimuler la production d'œufs, les animaux adultes sont transférés dans des boîtes de Petri contenant un substrat de plâtre de Paris et de charbon de bois fraîchement préparé.

1.c. *Source de nourriture*

Pour *F. candida* comme pour *F. fimetaria*, la seule source de nourriture utilisée est constituée de levure de boulanger sèche en granulés. De la nourriture fraîche leur est fournie une ou deux fois par semaine, afin d'éviter la moisissure. Elle est directement placée en un petit tas sur le plâtre de Paris. La quantité de levure de boulanger ajoutée devrait être ajustée à la taille de la population de collemboles, mais un apport de 2 à 15 mg sera généralement suffisant.

2. **Synchronisation**

L'essai est mené avec des animaux synchronisés afin de disposer d'animaux d'essai homogènes, au même stade de développement et de même taille. Qui plus est, la synchronisation permet de distinguer les *F. fimetaria* mâles des femelles à partir de l'âge de 3 semaines sur la base de leur dimorphisme sexuel, c'est-à-dire de leurs différences de tailles. La procédure ci-dessous constitue une suggestion quant à la manière d'obtenir des animaux synchronisés (les étapes concrètes sont facultatives).

2.a. *Synchronisation.*

— Préparer des récipients contenant une couche de 0,5 cm de substrat constitué de plâtre de Paris et de charbon de bois.

— Pour la ponte, transférer dans les récipients de 150 à 200 *F. fimetaria* adultes et de 50 à 100 *F. candida* tirés des 15 à 20 meilleurs récipients de la culture mère avec un substrat vieux de 4 à 8 semaines et les nourrir avec 15 mg de levure de boulanger. Éviter de mêler des juvéniles aux adultes car la présence de juvéniles risquerait d'inhiber la production d'œufs.

— Maintenir la culture à 20 ± 1 °C (la moyenne devrait être de 20 °C) et sous des cycles de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité (avec un éclairement de 400 à 800 lux). Veiller à ce que de la nourriture fraîche soit disponible et à ce que l'air soit saturé d'eau. Le manque de nourriture peut amener les animaux à déféquer sur les œufs, aboutissant à la formation de moisissures sur ceux-ci, ou encore *F. candida* pourrait cannibaliser ses propres œufs. Après 10 jours les œufs sont soigneusement collectés avec une épingle et une spatule et déposés sur du «papier à œufs» (petits morceaux de papier filtre plongés dans une barbotine de plâtre de Paris et de charbon de bois) qui est placé dans un récipient contenant un substrat frais constitué de plâtre et de charbon de bois. Quelques grains de levure sont ajoutés au substrat pour attirer les juvéniles et leur faire quitter ledit papier. Il importe que ce papier tout comme le substrat soient humides, car sinon les œufs souffriront de déshydratation. Une autre solution consiste à retirer les animaux adultes des boîtes de culture synchronisée après qu'ils ont produit des œufs pendant 2 ou 3 jours.

— Après trois jours, la plupart des œufs déposés sur le papier auront éclos, et quelques juvéniles pourront être trouvés sous celui-ci.

— Pour obtenir des juvéniles d'âge homogène, le papier et les œufs non éclos présents sur celui- ci sont retirés de la boîte de Petri à l'aide de pinces. Désormais âgés de 0 à 3 jours, les juvéniles demeurent dans le récipient et sont nourris avec de la levure de boulanger. Les œufs non éclos sont jetés.

— Les œufs et les juvéniles éclos sont cultivés de la même manière que les adultes. Pour *F. fimetaria* en particulier, il conviendrait de prendre les dispositions suivantes: fournir suffisamment de nourriture fraîche et retirer la vieille nourriture qui commence à moisir, puis après 1 semaine répartir les juvéniles dans de nouvelles boîtes de Petri sous réserve que leur densité demeure supérieure à 200.

▼**M6**

2.b. *Gestion des collemboles au début de l'essai*

— Les *F. candida* âgés de 9 à 12 jours ou les *F. fimetaria* âgés de 23 à 26 jours sont collectés, par exemple par aspiration, puis relâchés dans un petit récipient contenant un substrat humide constitué de plâtre et de charbon de bois, leur condition physique étant contrôlée sous le stéréomicroscope (les animaux blessés ou ayant subi des dommages sont éliminés). Il convient de suivre les différentes étapes en maintenant les collemboles dans une atmosphère humide afin d'éviter tout stress dû à la sécheresse, en utilisant par exemple des surfaces humidifiées, etc.

— Retourner le récipient et en tapoter le fond afin de transférer les collemboles sur le sol. Il convient de neutraliser l'électricité statique, au risque que les animaux se retrouvent sinon tout simplement en suspension dans l'air, ou adhèrent aux parois du récipient expérimental et s'y dessèchent. Un ioniseur ou un morceau de tissu humide placé sous le récipient peuvent être utilisés à cet effet.

— La nourriture devrait être répartie sur toute la surface du sol et non disposée en un seul bloc.

— Lors du transport et durant la période d'essai, il convient d'éviter de heurter ou de déranger physiquement de quelque autre manière les récipients d'essai, car cela risque d'accroître le tassement du sol et de compromettre l'interaction entre les collemboles.

3. **Autres espèces de collemboles**

D'autres espèces de collemboles peuvent être choisies pour procéder à des essais conformes à la présente méthode d'essai, comme par exemple Proisotoma minuta, Isotoma viridis, Isotoma anglicana, Orchesella cincta, Sinella curviseta, Paronychiurus kimi, Orthonychiurus folsomi, ou encore Mesaphorura macrochaeta. Un certain nombre de conditions préalables sont toutefois réunies avant d'utiliser ces autres espèces:

— Elles sont clairement identifiées;

— Les raisons du choix de l'espèce retenue sont fournies;

— Il faut veiller à ce que la biologie de la reproduction soit incluse dans la phase d'essai, de sorte qu'elle sera potentiellement ciblée durant l'exposition;

— Leur cycle de vie est connu: âge de maturation, durée de développement des œufs, et stades de développement susceptibles d'être soumis à l'exposition;

— Le substrat d'essai et la quantité de nourriture disponible garantissent des conditions optimales de croissance et de reproduction;

— La variabilité est suffisamment faible pour permettre une estimation précise et exacte de la toxicité.

▼M6

Appendice 4

Extraction et comptage des animaux

1. **Deux méthodes d'extraction peuvent être appliquées.**

1.a. Première méthode: Un extracteur à gradient de température contrôlé reposant sur les principes énoncés par MacFadyen peut être utilisé (1). La chaleur émanant d'un dispositif de chauffage situé sur la partie supérieure de la boîte d'extraction est régulée par un thermistor placé à la surface de l'échantillon de sol. La température du liquide réfrigéré entourant le récipient de collecte est régulée par un thermistor situé à la surface de la boîte de collecte (placée sous l'échantillon de sol). Les thermistors sont reliés à une unité de contrôle programmable qui élève la température selon un schéma préétabli. Les animaux sont collectés dans la boîte de collecte réfrigérée (2 °C) dont le fond contient une couche constituée de plâtre de Paris et de charbon de bois. L'extraction débute à 25 °C et la température est ensuite automatiquement augmentée de 5 °C toutes les 12 h sur une durée totale de 48 heures. Après 12 h à 40 °C l'extraction est achevée.

1.b. Seconde méthode: Au terme de la période d'incubation expérimentale le nombre de collemboles juvéniles présents est évalué par flottation. À cet effet, l'essai est réalisé dans des récipients d'un volume d'environ 250 ml. Environ 200 ml d'eau distillée sont ajoutés à la fin de l'essai. Le sol est remué doucement à l'aide d'un pinceau fin en vue de permettre aux collemboles de remonter à la surface de l'eau. Une petite quantité, environ 0,5 ml, de teinture photographique noire Kentmere peut être ajoutée à l'eau pour faciliter le comptage en augmentant leappend contraste entre l'eau et les collemboles blancs. Cette teinture n'est pas toxique pour les collemboles.

2. **Comptage:**

le comptage des animaux peut être effectué à l'œil nu ou à l'aide d'un microscope optique après avoir placé une grille sur le récipient de flottation, ou encore en photographiant la surface de chaque récipient puis en comptant ultérieurement les collemboles sur des agrandissements ou sur des projections de diapositives. Le comptage peut également être réalisé à l'aide de techniques de traitement numérique de l'image (12). Toutes ces techniques sont validées.

▼**M6**

Appendice 5

Détermination de la capacité maximale de rétention d'eau du sol

La méthode suivante de détermination de la capacité maximale de rétention d'eau du sol a fait ses preuves. Elle est décrite à l'annexe C de la norme ISO DIS 11268-2 (Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*). Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction).

Prélevez une quantité déterminée (5 g, par exemple) du sol expérimental servant de substrat à l'aide d'un instrument approprié (tarière, etc.). Couvrez le fond de la tarière avec un morceau de papier filtre humide et placez-la sur un support dans un bain d'eau. La tarière est progressivement submergée jusqu'à ce que le niveau d'eau dépasse le sommet de la carotte de sol. Laissez la tarière dans l'eau durant environ trois heures. Comme l'eau absorbée par les capillaires du sol ne peut pas être retenue en totalité, laissez l'échantillon de sol dégorger durant deux heures, en plaçant le tube sur un lit de sable quartzique fin très humide contenu dans un récipient fermé (pour empêcher le séchage). Pesez l'échantillon et séchez-le à 105 °C jusqu'à ce qu'il atteigne une masse constante. La capacité de rétention d'eau (CRE) est calculée comme suit:

$$\text{CRE (en \% de masse sèche)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

où:

S = masse du substrat saturé en eau + masse de la tarière + masse du papier filtre

T = tare (masse de la tarière + masse du papier filtre)

D = masse sèche du substrat

▼**M6**

Appendice 6

Détermination du pH du sol

La méthode de détermination du pH d'un sol, décrite ci-dessous s'appuie sur la norme ISO 10390: Qualité du sol — Détermination du pH.

On laisse sécher une quantité définie de sol à température ambiante durant au moins 12 heures. On prépare une suspension du sol (contenant au moins 5 g de sol) dans cinq fois son volume d'une solution de chlorure de potassium (KCl) 1 M de qualité analytique ou d'une solution de chlorure de calcium ($CaCl_2$) 0,01 M de qualité analytique. On agite vigoureusement la suspension durant cinq minutes et on la laisse sédimenter durant au moins deux heures, mais pas plus de 24 heures. On mesure ensuite le pH de la phase liquide à l'aide d'un pH-mètre, étalonné avant chaque mesure à l'aide d'une série appropriée de solutions tampons (pH 4,0 et 7,0, par exemple).

▼M6

C.40. ESSAI DE TOXICITÉ SUR LE CYCLE DE VIE DES CHIRONOMES DANS UN SYSTÈME EAU-SÉDIMENT CHARGÉ OU EAU CHARGÉE-SÉDIMENT

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 233 (2010) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Elle est conçue pour évaluer les effets d'une exposition vie entière à des substances chimiques chez *Chironomus* sp., un diptère d'eau douce, en couvrant toute la durée de vie de la première génération (génération P) et la première partie de la vie de la deuxième génération (génération F1). Elle prolonge les méthodes d'essai C.28 (1) ou C.27 (15) existantes, dans lesquelles l'exposition s'effectue respectivement à l'aide d'un système eau chargée-sédiment ou d'un système eau-sédiment chargé. Cette méthode d'essai s'appuie sur des protocoles d'essais de toxicité sur *Chironomus riparius* et *Chironomus dilutus* [anciennement dénommé *C. tentans* (2)], mis au point en Europe et en Amérique du Nord (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) puis soumis à des essais interlaboratoires (1) (7) (10) (11) (12). Il est également possible d'utiliser d'autres espèces de chironomes pour lesquelles il existe une littérature conséquente, telles que *Chironomus yoshimatsui* (13) (14). La durée totale d'exposition est d'environ 44 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui*, et d'environ 100 jours pour *C. dilutus*.

2. La présente méthode d'essai décrit des scénarios d'exposition dans l'eau et le sédiment respectivement. Le choix du mode d'exposition dépend de la finalité de l'essai. Le mode d'exposition qui consiste à charger la colonne d'eau vise à simuler des pertes par dispersion lors de l'épandage de pesticides et couvre le pic de concentration initial dans les eaux de surface. Le chargement de la colonne d'eau s'applique également à d'autres types d'exposition (notamment déversements de substances chimiques), mais non aux processus d'accumulation dans le sédiment d'une durée supérieure à celle de l'essai. Dans ce dernier cas, mais aussi lorsque le ruissellement est la principale voie d'entrée des pesticides dans les masses d'eau, il peut être préférable de charger le sédiment. Si d'autres modes d'exposition sont envisagés, le protocole d'essai peut facilement être adapté. Par exemple, si la répartition de la substance chimique d'essai entre la phase aqueuse et la couche de sédiment ne présente pas d'intérêt, et qu'il est nécessaire de limiter au maximum l'adsorption sur le sédiment, on peut envisager d'avoir recours à un sédiment de substitution artificiel (tel que du sable quartzique).

3. En général, les substances chimiques à tester sur des organismes vivant dans les sédiments subsistent longtemps dans le sédiment. Ces organismes peuvent être exposés par diverses voies. L'importance relative de chaque voie d'exposition et le temps pris par chacune d'entre elles pour contribuer à l'effet toxique global dépendent des propriétés physico-chimiques de la substance. Dans le cas de substances chimiques fortement adsorbantes ou de substances liées par covalence au sédiment, l'ingestion d'aliments contaminés peut se révéler une voie d'exposition significative. Afin de ne pas sous-estimer la toxicité des substances chimiques fortement lipophiles, on envisagera d'ajouter de la nourriture au sédiment avant l'application de la substance d'essai (voir paragraphe 31). Il est donc possible d'inclure toutes les voies d'exposition et tous les stades du cycle de vie.

4. Les effets mesurés sont le nombre total d'adultes émergés (pour la 1ère et la 2ème génération), la vitesse de développement (pour la 1ère et la 2ème génération), le sex-ratio des adultes totalement émergés et vivants (pour la 1ère et la 2ème génération), le nombre d'amas cylindriques d'œufs par femelle (1ère génération uniquement) et le taux de fertilité des amas d'œufs (1ère génération uniquement).

5. L'utilisation d'un sédiment reconstitué est vivement recommandée en raison de ses avantages par rapport aux sédiments naturels:

▼M6

— la variabilité expérimentale est réduite car le sédiment reconstitué forme une «matrice normalisée» reproductible; en outre, il n'est plus nécessaire de trouver des sources de sédiments non contaminés et non pollués;

— les essais peuvent être effectués à n'importe quel moment de l'année, la variabilité saisonnière n'intervenant plus, et il n'est pas nécessaire de traiter préalablement le sédiment pour éliminer la faune indigène;

— le coût est réduit par rapport à la collecte sur le terrain d'une quantité suffisante de sédiments pour les essais en routine;

— les sédiments reconstitués permettent de comparer la toxicité des substances chimiques entre les différentes études (3).

6. Les définitions utilisées figurent à l'Appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. Des chironomes au premier stade larvaire sont exposés à une gamme de concentrations de la substance chimique d'essai dans un système sédiment-eau. L'essai débute par l'introduction de larves du premier stade ($1^{ère}$ génération) dans des béchers expérimentaux contenant du sédiment chargé. Il est également possible d'injecter la substance chimique d'essai dans l'eau après l'introduction des larves. L'émergence des chironomes, le délai d'émergence et le sex-ratio des moucherons complètement émergés et vivants sont évalués. Les adultes émergés sont transférés dans des cages d'élevage pour faciliter l'essaimage, l'accouplement et la ponte. Le nombre d'amas d'œufs et leur fertilité sont évalués. Ces amas d'œufs produisent les larves du premier stade de la $2^{ème}$ génération. Ces larves sont placées dans des béchers expérimentaux fraîchement préparés (les récipients sont chargés de la même façon que pour la $1^{ère}$ génération) afin de déterminer la viabilité de la $2^{ème}$ génération via l'évaluation de l'émergence des chironomes, du délai d'émergence et du sex-ratio des moucherons complètement émergés et vivants (on trouvera à l'Appendice 5 une présentation schématique de l'essai sur le cycle de vie). Toutes les données sont analysées, soit en utilisant un modèle de régression pour estimer la concentration qui entraînerait une réduction de x % de l'effet mesuré, soit en ayant recours à un test d'hypothèse pour déterminer une concentration sans effet observé (CSEO). Cette dernière méthode nécessite une comparaison des réponses au traitement avec les réponses témoins adéquates à l'aide de tests statistiques. Il convient de noter que dans le système eau chargée, en cas d'utilisation de substances chimiques se dégradant rapidement, les dernières phases du cycle de vie de chaque génération (par exemple la phase pupale) peuvent être exposées à un niveau de concentration bien plus faible dans l'eau sus-jacente que les larves du premier stade. Si cela pose problème et qu'un niveau d'exposition similaire est nécessaire pour chaque phase du cycle de vie, on peut alors envisager de modifier la méthode d'essai comme suit:

— expériences parallèles avec chargement du système à différentes phases du cycle de vie, ou

— chargement répété (ou renouvellement de l'eau sus-jacente) du système expérimental au cours des deux phases de l'essai ($1^{ère}$ et $2^{ème}$ génération), les intervalles de chargement (renouvellement) devant être ajustés en fonction des caractéristiques du devenir de la substance chimique d'essai.

De telles modifications sont envisageables uniquement dans le système eau chargée, et non dans le système sédiment chargé.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

8. Il est nécessaire de connaître l'hydrosolubilité de la substance chimique d'essai, sa pression de vapeur et son log K_{oe}, son coefficient de partage mesuré ou calculé dans le sédiment, et sa stabilité dans l'eau et le sédiment. Il convient de disposer, pour quantifier la substance d'essai dans

▼M6

l'eau sus-jacente, l'eau interstitielle et le sédiment, d'une méthode d'analyse fiable dont la précision et le seuil de détection sont connus. Il est également utile de connaître la formule structurale et la pureté de la substance chimique d'essai ainsi que son devenir chimique (par exemple dissipation, dégradation abiotique et biotique, etc.). Des conseils pour tester les substances chimiques se prêtant difficilement à l'essai en raison de leurs propriétés physico-chimiques sont fournis à la référence (16).

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

9. Il est possible de tester régulièrement des substances chimiques de référence afin de s'assurer que la sensibilité de la population du laboratoire n'a pas évolué. Comme pour les daphnies, il est suffisant d'effectuer un test de toxicité aiguë de 48 heures (tel que celui décrit dans la référence (17)). Toutefois, dans l'attente qu'une ligne directrice validée soit disponible pour la toxicité aigüe, il peut être envisagé de réaliser un essai de toxicité chronique selon la méthode C.28 de la présente annexe. Parmi les toxiques de référence ayant fait leurs preuves dans des essais interlaboratoires et des études de validation, citons le lindane, la trifluraline, le pentachlorophénol, le chlorure de cadmium et le chlorure de potassium. (1) (3) (6) (7) (18).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

10. Pour que l'essai soit valable, les conditions suivantes doivent être remplies:

— l'émergence moyenne dans le système témoin est d'au moins 70 % à la fin de la période d'exposition pour les deux générations (1) (7);

— pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui*, 85 % du total des moucherons adultes émergés du système témoin pour les deux générations doivent apparaître entre 12 et 23 jours après l'introduction des larves de premier stade dans les récipients; pour *C. dilutus*, une période de 20 à 65 jours est acceptable;

— le sex-ratio moyen des adultes totalement émergés et vivants (proportion de femelles ou de mâles) dans le système témoin pour les deux générations est d'au moins 0,4, mais ne dépasse pas 0,6;

— pour chaque cage d'élevage, le nombre d'amas d'œufs dans les cultures témoin de la 1ère génération est d'au moins 0,6 par femelle introduite dans la cage d'élevage;

— la fraction des amas d'œufs fertiles dans chaque cage d'élevage des témoins de la 1ère génération est d'au moins 0,6;

— à l'issue de la période d'exposition pour les deux générations, le pH et la concentration d'oxygène dissous sont mesurés dans chaque récipient. La concentration d'oxygène doit atteindre au moins 60 % de la valeur de saturation en air (VSA ([1])), et le pH de l'eau sus-jacente doit être compris entre 6 et 9 dans tous les récipients expérimentaux;

— la température de l'eau ne varie pas de plus de ± 1,0 °C.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Récipients expérimentaux et cages d'élevage

11. Les larves sont exposées dans des béchers en verre de 600 ml, mesurant environ 8,5 cm de diamètre (voir Appendice 5). D'autres récipients peuvent être utilisés à condition que la profondeur de l'eau sus-jacente et celle du sédiment puissent être suffisantes. Le sédiment doit offrir une superficie de 2 à 3 cm^2 par larve. Le rapport de l'épaisseur de la couche de sédiment à celle de la couche d'eau sus-jacente doit être à peu près égal à 1/4. Il convient d'utiliser des cages d'élevage (de 30 cm minimum pour

([1]) À 20 °C et à la pression atmosphérique standard, la VSA de l'eau douce est de 9,1 mg/l (60 % représentant 5,46 mg/l)

▼M6

chacune des trois dimensions) dont le dessus et au moins un côté sont recouverts d'une gaze (maillage d'environ 1 mm) (voir Appendice 5). Dans caque cage, on dispose pour la ponte un cristallisoir de 2 l contenant un système expérimental eau-sédiment. Pour le cristallisoir également, le rapport de l'épaisseur de la couche de sédiment à celle de l'eau sus-jacente doit être à peu près égal à 1/4. Après avoir collecté les amas d'œufs dans le cristallisoir, on les transfère sur une plaque de microtitration à 12 puits (un amas par puits contenant au moins 2,5 ml d'eau prélevée dans le cristallisoir chargé), sur laquelle on place ensuite un couvercle afin d'éviter une trop forte évaporation. D'autres récipients peuvent également convenir pour recevoir les amas d'œufs. À l'exception des plaques de microtitration, tous les récipients et les autres appareils qui entreront en contact avec le système d'essai doivent être composés uniquement de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte (polytétrafluoroéthylène, par exemple).

Sélection des espèces

12. *Chironomus riparius* est l'espèce qui convient le mieux. *C. yoshimatsui* convient également. *C. dilutus* peut aussi être utilisé, mais il est plus difficile à manipuler et nécessite une période d'essai plus longue. La méthode de culture de *C. riparius* est détaillée à l'Appendice 2. On dispose également d'informations sur les conditions de culture de *C. dilutus* (5) et *C. yoshimatsui* (14). L'identification des espèces est à confirmer avant l'essai, mais n'est pas requise avant chaque essai si les organismes ont été cultivés sur place.

Sédiment

13. Il est préférable d'employer un sédiment reconstitué (également dénommé sédiment artificiel ou synthétique). Néanmoins, si l'on opte pour un sédiment naturel, il convient de le caractériser, au moins quant au pH et à la teneur en carbone organique (la détermination d'autres paramètres, tels que le rapport C/N et la granulométrie est aussi recommandée), et de s'assurer qu'il n'est pas contaminé et n'abrite pas d'autres organismes qui pourraient entrer en compétition avec les larves de chironomes ou les consommer. Avant d'utiliser un sédiment naturel dans un essai, il est également recommandé de le maintenir durant sept jours dans des conditions identiques à celles de l'essai. II est recommandé d'utiliser le sédiment reconstitué suivant, tel que décrit en (1) (20) (21):

a. 4-5 % (poids sec) de tourbe, avec un pH aussi proche que possible de 5,5 à 6,0; il importe d'utiliser une tourbe en poudre, finement broyée (dimension des particules≤ 1 mm) et séchée uniquement à l'air;

b. 20 % (poids sec) d'argile kaolinique (teneur en kaolinite de préférence supérieure à 30 %);

c. 75-76 % (poids sec) de sable quartzique (composé en majorité de sable fin, plus de 50 % des particules mesurant entre 50 et 200 μm);

d. Ajouter de l'eau désionisée jusqu'à ce que la teneur en humidité du mélange final soit comprise entre 30 et 50 %;

e. Ajouter du carbonate de calcium de qualité chimiquement pure ($CaCO_3$) afin d'ajuster le pH du mélange final de sédiments à 7,0 ± 0,5;

f. Il convient d'obtenir 2 % (± 0,5 %) de carbone organique dans le mélange final en y ajoutant les quantités appropriées de tourbe et de sable, comme indiqué en (a) et en (c).

14. Les sources de tourbe, d'argile kaolinique et de sable doivent être connues. On vérifiera que les composants du sédiment ne sont pas contaminés par

▼M6

des substances chimiques (métaux lourds, composés organochlorés, composés organophosphorés, etc.). Un exemple de préparation de sédiment reconstitué est décrit à l'Appendice 3. Les composants du sédiment peuvent aussi être mélangés à l'état sec, à condition de démontrer qu'ils ne se séparent pas après l'ajout de l'eau sus-jacente (flottement de particules de tourbe, par exemple) et que la tourbe ou le sédiment sont suffisamment conditionnés.

Eau

15. Toute eau conforme aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable selon les critères spécifiés aux annexes 2 et 4 convient à l'essai. Toute eau appropriée, naturelle (eau superficielle ou souterraine), reconstituée (voir Appendice 2) ou eau du robinet déchlorée, est acceptable comme eau de culture et d'essai, si les chironomes y survivent sur toute la durée de la culture et de l'essai sans manifester de signes de stress. Au début de l'essai, le pH de l'eau d'essai se situera entre 6 et 9 et sa dureté totale ne dépassera pas 400 mg/l en $CaCO_3$. Néanmoins, si l'on suspecte une interaction entre les ions de dureté et la substance chimique d'essai, il faut utiliser une eau moins dure (auquel cas le milieu Elendt M4 ne pourra pas être utilisé). Le même type d'eau doit être utilisé tout au long de l'étude. Les caractéristiques de qualité de l'eau énumérées à l'Appendice 4 sont à mesurer au moins deux fois par an ou chaque fois qu'elles sont susceptibles d'avoir été significativement modifiées.

Solutions-mères — eau chargée

16. a. Les concentrations expérimentales sont calculées en fonction des concentrations dans la colonne d'eau surmontant le sédiment. Les solutions d'essai sont généralement préparées aux concentrations choisies par dilution d'une solution-mère. Il est préférable de préparer les solutions-mères en dissolvant la substance chimique d'essai dans l'eau d'essai. Dans certains cas, il sera nécessaire d'utiliser des solvants ou des dispersants pour obtenir une solution-mère à la concentration voulue. Parmi les solvants appropriés, on peut citer l'acétone, l'éther monométhylique d'éthylène-glycol, l'éther diméthylique d'éthylène-glycol, le diméthylformamide et le triéthylène-glycol. Parmi les dispersants appropriés, citons le Cremophor RH40, le Tween 80, la méthylcellulose à 0,01 % et le HC0-40. La concentration de l'agent solubilisant dans le milieu d'essai final doit être minimale (≤ 0,1 ml/l) et identique dans tous les traitements. En cas d'utilisation d'un agent solubilisant, celui-ci ne doit avoir aucun effet significatif sur la survie des chironomes, ce qui pourra être démontré par la comparaison d'un témoin solvant avec un témoin négatif (eau). Il faut cependant s'efforcer, dans toute la mesure du possible, d'éviter d'utiliser ces produits.

Solutions-mères — sédiment chargé

16. b. On prépare généralement les sédiments chargés à la concentration souhaitée en ajoutant directement une solution de la substance chimique d'essai au sédiment. Une solution-mère de la substance d'essai dissoute dans de l'eau désionisée est mélangée au sédiment reconstitué à l'aide d'un laminoir, d'un mélangeur d'aliments ou mélangée à la main. Si la substance chimique d'essai est peu soluble dans l'eau, elle peut être dissoute dans un volume aussi faible que possible d'un solvant organique adéquat (hexane, acétone ou chloroforme, par exemple). Cette solution est ensuite mélangée à 10 g de sable quartzique fin par récipient expérimental. Il faut attendre que le solvant s'évapore jusqu'à être totalement éliminé du sable; le sable est ensuite mélangé avec la quantité appropriée de sédiment. Seuls des agents très volatils peuvent être utilisés pour solubiliser, disperser ou émulsifier la substance chimique d'essai. On n'oubliera pas

▼M6

de tenir compte de la quantité de sable apportée avec le mélange de substance d'essai et de sable lors de la préparation du sédiment (ce dernier sera préparé avec moins de sable). Il faudra veiller à mélanger complètement la substance d'essai au sédiment et à l'y répartir uniformément. Si nécessaire, on analysera des sous- échantillons afin de déterminer le degré d'homogénéité.

PROTOCOLE D'ESSAI

17. Le protocole d'essai définit le nombre et l'espacement des concentrations expérimentales, le nombre de récipients par concentration, le nombre de larves par récipient, et le nombre de cristallisoirs et de cages d'élevage. La marche à suivre pour établir la CE_x et la CSEO et pour réaliser un essai limite est décrite ci-dessous.

Conduite d'une analyse de régression

18. L'essai doit couvrir la concentration efficace (CE_x,) et la gamme de concentrations auxquelles la substance chimique d'essai produit un effet intéressant, de façon à ce que l'effet observé ne soit pas extrapolé hors des limites des données générées. On évitera d'extrapoler des résultats très en dessous de la concentration la plus faible ou au-dessus de la concentration la plus forte. Il pourra être utile de réaliser un essai préliminaire de détermination des concentrations d'essai, conformément à la méthode d'essai C.27 ou C.28, de façon à définir la gamme des concentrations à utiliser.

19. Pour estimer la CE_x, un minimum de cinq concentrations et huit réplicats par concentration sont nécessaires. Pour chaque concentration, deux cages d'élevage seront utilisées (A et B). Les huit réplicats sont scindés en deux groupes de quatre réplicats (un groupe par cage). Ce regroupement des réplicats est nécessaire en raison du nombre de moucherons à atteindre dans les cages pour obtenir des évaluations fiables de leur reproduction. La $2^{ème}$ génération compte aussi huit réplicats, obtenus à partir des populations exposées dans les cages d'élevage. Le facteur séparant les concentrations ne doit pas excéder deux (une exception peut être faite si la courbe dose-effet présente une pente faible). Le nombre de réplicats par traitement peut être ramené à six (trois pour chaque cage d'élevage) si le nombre de concentrations expérimentales entraînant différents effets est augmenté. L'augmentation du nombre d'expériences identiques ou la diminution des écarts entre les concentrations expérimentales tend à réduire les intervalles de confiance autour de la CE_x.

Procédure d'estimation d'une CSEO

20. Pour estimer la CSEO, cinq concentrations expérimentales et au moins huit réplicats par concentration (quatre pour chaque cage d'élevage, A et B) seront nécessaires, le facteur séparant les concentrations n'excédant pas deux. Le nombre de réplicats doit être suffisant pour fournir une puissance statistique permettant de détecter une différence de 20 % avec le témoin, au seuil de signification statistique de 5 % (α = 0,05). Pour la vitesse de développement, la fécondité et la fertilité, il est généralement utile d'effectuer une analyse de variance (ANOVA), suivie d'un test de Dunnett ou d'un test de Williams (22-25). S'agissant du taux d'émergence et du sex-ratio, le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction selon Bonferroni) ou le test de Mantel-Haentzal peuvent être appropriés.

Essai limite

21. La conduite d'un essai limite peut être envisagée (sur une concentration expérimentale et un ou plusieurs témoins) si l'essai préliminaire facultatif de détermination des concentrations d'essai n'a permis d'observer aucun effet à une concentration maximale. L'essai limite a pour objet d'indiquer si des effets toxiques de la substance chimique d'essai sont décelés à des niveaux supérieurs aux concentrations limites étudiées. Les quantités

▼M6

recommandées sont 100 mg/l pour l'eau et 1 000 mg/kg (poids sec) pour le sédiment. Huit réplicats au moins sont généralement nécessaires pour le traitement et le témoin. Une puissance statistique suffisante pour détecter une différence de 20 % avec le témoin au seuil de signification statistique de 5 % (α = 0,05) devrait être démontrée. Pour les mesures métriques (par exemple, la vitesse de développement), le test t constitue une méthode statistique appropriée si les données répondent aux critères de ce test (normalité, variances homogènes). Un test t de variance inégale ou bien un test non paramétrique tel que le test de Wilcoxon-Mann-Whitney peuvent être employés lorsque ces conditions ne sont pas satisfaites. S'agissant du taux d'émergence, le test exact de Fisher est approprié.

PROCÉDURE

Conditions d'exposition

Préparation du système eau-sédiment (eau chargée)

22.a. Un sédiment reconstitué (voir paragraphes 13-14 et Appendice 3) est introduit dans chaque récipient expérimental et dans le cristallisoir de façon à former une couche d'au moins 1,5 cm (qui peut être un peu moins épaisse dans le cristallisoir) et d'au plus 3 cm. L'eau (voir paragraphe 15) est ensuite versée de manière à ce que le rapport de l'épaisseur de la couche de sédiment à celle de la couche d'eau ne dépasse pas 1/4. Une fois la préparation des récipients expérimentaux achevée, le système sédiment-eau doit être soumis à une légère aération pendant environ sept jours avant l'introduction des chironomes au premier stade larvaire de la 1ère ou de la 2ème génération (voir paragraphe 14 et Appendice 3). Le système sédiment-eau des cristallisoirs n'est pas aéré au cours de l'essai, car il n'a pas à assurer la survie des larves (avant l'éclosion, les amas d'œufs sont déjà collectés). Afin d'éviter la séparation des ingrédients du sédiment et la remise en suspension des particules fines lors du remplissage de la colonne d'eau, on peut recouvrir le sédiment d'un disque en plastique durant cette opération et retirer le disque juste après. D'autres dispositifs peuvent aussi convenir.

Préparation du système eau-sédiment (sédiment chargé)

22.b. On dépose les sédiments chargés, préparés comme indiqué au paragraphe 16b, au fond des récipients et du cristallisoir avant d'y verser l'eau sus-jacente, de façon à obtenir un rapport volumique sédiment-eau de 1/4. La profondeur de la couche de sédiment doit être comprise entre 1,5 et 3 cm (elle peut être légèrement inférieure dans le cristallisoir). Afin d'éviter la séparation des ingrédients du sédiment et la remise en suspension des particules fines lors du remplissage de la colonne d'eau, on peut recouvrir le sédiment d'un disque en plastique durant cette opération et retirer le disque juste après. D'autres dispositifs peuvent aussi convenir. Une fois préparé le sédiment chargé surmonté d'une couche d'eau, il est souhaitable de laisser la substance d'essai se répartir entre la phase aqueuse et le sédiment (4) (5) (7) (18), de préférence dans les mêmes conditions de température et d'aération que durant l'essai. La durée d'équilibrage appropriée dépend du sédiment et de la substance chimique; elle peut être de l'ordre de quelques heures à quelques jours, et dans de rares cas atteindre cinq semaines. Il ne faut pas attendre que l'équilibre soit atteint car de nombreuses substances auraient le temps de se dégrader, mais une période d'équilibrage de 48 heures est recommandée. Toutefois, s'il est connu que la demi-vie de la substance chimique dans le sédiment est longue (voir paragraphe 8), la durée d'équilibrage peut être allongée. Au terme de cette période d'équilibrage, on mesure la concentration de la substance d'essai dans l'eau sus-jacente, l'eau interstitielle et le sédiment, au moins pour la concentration la plus élevée et une concentration plus faible (voir paragraphe 38). Ces déterminations analytiques de la substance chimique d'essai permettent de calculer le bilan massique et d'exprimer les résultats en fonction des concentrations mesurées.

23. Les récipients expérimentaux sont couverts (par des plaques de verre, par exemple). Si nécessaire, on remplace les volumes d'eau évaporée durant l'étude avec de l'eau distillée ou désionisée afin d'empêcher l'accumulation de sels. Les cristallisoirs placés dans les cages d'élevage ne sont pas

▼M6

couverts. Il est possible, mais pas indispensable, de remplacer l'eau perdue au cours de la durée de l'essai, puisque les amas d'œufs n'y sont en contact avec l'eau que pendant un jour environ, et que les cristallisoirs ne sont utilisés que pendant une courte phase de l'essai.

Introduction des organismes expérimentaux

24. Quatre à cinq jours avant l'introduction des larves du premier stade de la 1ère génération, les amas d'œufs sont prélevés dans la culture et placés dans de petits récipients contenant du milieu de culture. Il est possible d'utiliser un milieu plus ancien issu de la culture-mère ou un milieu fraîchement préparé. Dans les deux cas, on ajoutera au milieu de culture une petite quantité de nourriture, par exemple quelques gouttelettes de filtrat d'une suspension de paillettes pour poissons finement broyées (voir Appendice 2). Seuls des amas d'œufs fraîchement pondus peuvent être utilisés. Normalement, les larves commencent à éclore quelques jours après la ponte (2 à 3 jours pour *C. riparius* à 20 °C, et 1 à 4 jours pour *C. dilutus* à 23 °C et *C. yoshimatsui* à 25 °C) et le développement des larves se déroule en quatre stades, chacun d'une durée de 4 à 8 jours. L'essai doit être réalisé avec des chironomes au premier stade larvaire (maximum 48 h après éclosion). Il est possible de vérifier le stade de développement des larves d'après la largeur de la capsule céphalique (7).

25. Vingt larves du premier stade de la première génération, choisies au hasard, sont déposées à l'aide d'une pipette émoussée dans chaque récipient contenant le système sédiment-eau. L'aération de l'eau est interrompue pendant 24 heures à compter de l'introduction des larves de premier stade dans les récipients expérimentaux (voir paragraphe 32). Selon le protocole expérimental suivi (voir paragraphes 19 et 20), le nombre de larves utilisées par concentration sera d'au moins 120 (6 réplicats par concentration) pour la détermination de la CE_X et 160 pour la CSEO (8 réplicats par concentration). Dans le protocole d'essai avec sédiment chargé, l'exposition débute lors de l'introduction des larves.

Chargement de l'eau sus-jacente

26. Vingt-quatre heures après l'introduction des chironomes au premier stade larvaire de la 1ère génération dans les récipients expérimentaux, la substance d'essai est ajoutée à la colonne d'eau sus-jacente qui est de nouveau soumise à une légère aération (pour les modifications possibles du protocole d'essai, voir paragraphe 7). De faibles volumes des solutions-mères de la substance chimique d'essai sont injectés à l'aide d'une pipette sous la surface de l'eau. Ensuite, on mélange doucement l'eau sus-jacente en prenant soin de ne pas remuer le sédiment. Dans le protocole d'essai avec eau chargée, l'exposition débute avec l'ajout de la substance dans l'eau (c'est à dire un jour après l'introduction des larves).

Collecte des adultes émergés

27. Les moucherons émergés de la 1ère génération sont collectés au moins une fois, mais de préférence deux fois, par jour (voir paragraphe 36) dans les récipients expérimentaux à l'aide d'un aspirateur, d'un extracteur ou d'un autre dispositif similaire (voir Appendice 5). Il convient de prendre toutes les précautions nécessaires pour ne pas endommager les adultes. Les moucherons prélevés dans les quatre récipients expérimentaux ayant reçu le même traitement sont transférés dans la cage d'élevage qui leur a été attribuée préalablement. Le jour où apparaissent les premiers moucherons (mâles), on charge les cristallisoirs en injectant à l'aide d'une pipette un faible volume de la solution-mère de substance d'essai sous la surface de l'eau (protocole avec eau chargée). Ensuite, on mélange doucement l'eau sus-jacente en prenant soin de ne pas remuer le sédiment. La valeur nominale de la concentration de substance chimique d'essai est la même dans le cristallisoir que dans les récipients de traitement associés à cette cage d'élevage précise. Dans le protocole avec sédiment chargé, les

▼M6

cristallisoirs sont préparés vers le 11ème jour après le début de l'exposition (c'est-à-dire à compter de l'introduction de la 1ère génération de larves), de façon à ce que l'équilibrage soit achevé environ 48 heures avant la ponte des premiers amas d'œufs.

28. Les amas d'œufs sont collectés dans les cristallisoirs de la cage d'élevage à l'aide de pinces ou d'une pipette émoussée. Chaque amas est placé dans un récipient contenant un milieu de culture provenant du cristallisoir d'origine de l'amas (par exemple l'un des 12 puits d'une plaque de microtitration avec au moins 2,5 ml de milieu). Les récipients contenant les amas sont fermés par un couvercle afin d'éviter une évaporation importante. Les amas sont gardés en observation pendant 6 jours au minimum après la ponte, afin que l'on puisse les classer comme fertiles ou stériles.

Pour démarrer la 2ème génération, on choisit dans chaque cage d'élevage trois amas d'œufs fertiles au minimum, mais de préférence six, que l'on laisse éclore en présence d'un peu de nourriture. Ces amas devront avoir été produits lors du pic de ponte, qui intervient normalement autour du 19ème jour d'essai dans les récipients témoins. Dans l'idéal, tous les traitements sur la 2ème génération démarrent le même jour, mais en raison des effets liés aux substances chimiques d'essai sur le développement des larves, cela n'est pas toujours possible. Dans ce cas, mieux vaut lancer les traitements aux concentrations plus élevées après les traitements plus faibles et le témoin (solvant).

29.a. Dans le protocole avec eau chargée, le système sédiment-eau destiné à la 2ème génération se prépare en ajoutant la substance chimique d'essai dans la colonne d'eau sus-jacente environ 1 heure avant d'introduire les larves de premier stade dans les récipients expérimentaux. De faibles volumes des solutions contenant la substance d'essai sont injectés sous la surface de la colonne d'eau à l'aide d'une pipette. Ensuite, on mélange doucement l'eau sus-jacente en prenant soin de ne pas remuer le sédiment. Une fois la substance ajoutée, on procède à une légère aération.

29.b. Dans le protocole avec sédiment chargé, les récipients d'exposition contenant le système sédiment-eau pour la 2ème génération sont préparés de la même façon que ceux de la 1ère génération.

30. Vingt larves de premier stade (48 heures maximum après éclosion) de la 2ème génération, choisies au hasard, sont déposées à l'aide d'une pipette émoussée dans chaque récipient expérimental contenant le système eau-sédiment chargé. L'aération de l'eau doit être interrompue pendant au moins 24 heures à compter de l'introduction des larves de premier stade dans les récipients expérimentaux. Selon le protocole expérimental suivi (voir paragraphes 19 et 20), le nombre de larves utilisées par concentration sera d'au moins 120 (6 réplicats par concentration) pour la détermination de la CE_X et 160 pour la CSEO (8 réplicats par concentration).

Nourriture

31. Les larves ont besoin d'être nourries dans les récipients expérimentaux, de préférence quotidiennement ou au moins trois fois par semaine. Durant les dix premiers jours, chaque jeune larve reçoit quotidiennement 0,25 à 0,5 mg (0,35-0,5 mg pour C. yoshimatsui) de nourriture pour poissons (en suspension dans l'eau ou finement broyée, par exemple Tetra-Min ou Tetra-phyll; voir les détails à l'Appendice 2). Il peut être nécessaire d'augmenter légèrement cette quantité pour les larves plus âgées: 0,5 — 1,0 mg par larve et par jour devrait suffire pour le reste de l'essai. On diminue la ration alimentaire de tous les organismes traités et témoins si l'on constate le développement de champignons ou en cas de mortalité parmi les organismes témoins. Si la croissance fongique ne peut être enrayée, l'essai est à recommencer.

La pertinence toxicologique de l'exposition par ingestion est généralement plus grande pour les substances chimiques possédant une forte affinité

▼M6

pour le carbone organique ou les substances formant des liaisons de covalence avec le sédiment. Ainsi, lors d'essais sur des substances présentant de telles propriétés, la quantité de nourriture nécessaire à la survie et à la croissance naturelle des larves peut être incorporée au sédiment reconstitué avant la période de stabilisation, en fonction de la règlementation imposée. Afin d'éviter de détériorer la qualité de l'eau, la nourriture pour poissons est remplacée par une ration végétale, par exemple 0,5 % (poids sec) de feuilles finement broyées d'ortie (*Urtica dioeca*), de mûrier (*Morus alb*a), de trèfle blanc (*Trifolium repens*), d'épinard (*Spinacia oleracea*) ou d'un autre matériel végétal (*Cerophyl* ou *α*-cellulose). Incorporer toute la ration alimentaire d'origine organique au sédiment avant d'ajouter la substance d'essai n'est pas sans conséquence sur la qualité et les performances biologiques de l'eau (21), et ne constitue pas non plus une méthode normalisée; toutefois de récentes études indiquent que cette méthode fonctionne (19) (26). Les moucherons adultes de la cage d'élevage n'ont en principe pas besoin d'être nourris, mais la fécondité et la fertilité augmentent si l'on propose aux adultes émergés un tampon d'ouate imbibé d'une solution de sucrose saturée (34).

Conditions d'incubation

32. L'eau sus-jacente des récipients expérimentaux est soumise à une légère aération, mise en route 24 heures après l'introduction des larves du premier stade des deux générations, et maintenue jusqu'à la fin de l'essai (il faut veiller à ce que la concentration d'oxygène dissous ne tombe pas en dessous de 60 % de la VSA). L'air est insufflé à l'aide d'une pipette Pasteur en verre dont l'extrémité est fixée 2 à 3 cm au-dessus de la couche de sédiment et délivre quelques bulles par seconde. Si la substance chimique d'essai est volatile, on pourra éventuellement supprimer l'aération du système sédiment-eau, à condition de respecter le critère de validité de 60 % de la VSA (voir paragraphe 10). D'autres indications sont données à la référence (16).

33. L'essai sur *C. riparius* est mené à une température constante de 20 °C (± 2 °C). Pour *C. dilutus* et *C. yoshimatsui*, les températures recommandées sont respectivement de 23 °C et 25 °C (± 2 °C). La photopériode est de 16 heures et l'intensité lumineuse comprise entre 500 et 1 000 lux. Une phase supplémentaire d'une heure récréant l'aube et le crépuscule peut être prévue pour les cages d'élevage.

Temps d'exposition

34. Protocole avec eau chargée: la période d'exposition de la 1ère génération commence lorsque la substance d'essai est injectée dans l'eau sus-jacente des récipients expérimentaux (c'est-à-dire un jour après l'introduction des larves; voir au paragraphe 7 les modifications possibles du protocole d'exposition). L'exposition de la 2ème génération de larves débute immédiatement, car elles sont introduites dans un système sédiment-eau déjà chargé. Pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui*, le temps d'exposition maximal est de 27 jours pour la 1ère génération, et de 28 jours pour la 2ème génération (les larves de la 1ère génération passent une journée dans les récipients sans exposition). Compte tenu du chevauchement des deux expositions, la durée totale de l'essai est d'environ 44 jours. Pour *C. dilutus*, les durées maximales d'exposition sont de 64 et 65 jours respectivement pour la 1ère et la 2ème génération. Au total, l'essai dure environ 100 jours.

Protocole avec sédiment chargé: l'exposition débute avec l'introduction des larves et dure au maximum 28 jours pour les deux générations de *C. riparius* et *C. yoshimatsui*, et 65 jours au maximum pour les deux générations de *C. dilutus*.

Observations

Émergence

35. La durée du développement et le nombre total de moucherons mâles et femelles adultes totalement émergés et vivants sont à déterminer pour les deux générations. Les mâles sont faciles à identifier grâce à leurs antennes plumeuses et leur corps fin.

▼M6

36. Au moins trois fois par semaine, on vérifie que les larves des récipients expérimentaux des deux générations ne manifestent aucun comportement anormal (sortie du sédiment, nage inhabituelle, par exemple) par rapport aux témoins. Au cours de la période d'émergence, qui débute environ 12 jours après l'introduction des larves pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* (20 jours après pour *C. dilutus*), les moucherons émergés sont dénombrés et leur sexe est identifié au moins une fois, mais de préférence deux fois par jour (tôt le matin et en fin d'après-midi). Une fois identifiés, les moucherons de la 1ère génération sont retirés avec soin des récipients et transférés dans une cage d'élevage. Les moucherons de la 2ème génération sont retirés et tués après identification. Les amas d'œufs déposés dans les récipients expérimentaux de la 1ère génération doivent être collectés individuellement et transférés avec au moins 2,5 ml d'eau de formation dans des plaques de microtitration à 12 puits (ou tout autre récipient adapté) fermées par un couvercle afin d'éviter une évaporation importante. Le nombre de larves mortes et de pupes visibles n'ayant pas émergé doit également être consigné. L'Appendice 5 présente des exemples de cage d'élevage, de récipient expérimental et d'extracteur.

Reproduction

37. On évalue les effets sur la reproduction en déterminant le nombre d'amas d'œufs produits par la 1ère génération de moucherons et la fertilité de ces amas. Une fois par jour, les amas d'œufs sont collectés dans le cristallisoir de chaque cage d'élevage, et transférés avec au moins 2,5 ml d'eau de formation dans des plaques de microtitration à 12 puits (un amas par puits) ou d'autres récipients adaptés, fermés d'un couvercle afin d'éviter une évaporation importante. Les caractéristiques suivantes doivent être consignées par écrit pour chaque amas d'œufs: jour de ponte, taille (normale, soit 1,0 ± 0,3 cm, ou petite, généralement ≤ 0,5 cm), structure (normale = en forme de croissant avec cordon d'œufs spiralé, ou anormale, par exemple avec cordon non spiralé) et fertilité (fertile ou stérile). Sur une période de six jours après sa ponte, la fertilité de chaque amas d'œufs est évaluée. Un amas est considéré comme fertile lorsqu'au moins un tiers des œufs éclot. Le nombre total de femelles transférées dans la cage d'élevage sert à calculer le nombre d'amas d'œufs par femelle, et le nombre d'amas fertiles par femelle. Si nécessaire, le nombre d'œufs par amas peut être estimé de manière non destructive par la méthode des anneaux (expliquée dans les références 32 et 33).

Mesures analytiques

Concentration de la substance chimique d'essai

38. Il est recommandé d'analyser, au minimum, des échantillons de l'eau sus-jacente, de l'eau interstitielle et du sédiment au début de l'exposition (en cas d'eau chargée, de préférence une heure après l'application) et à la fin de l'essai, et ce pour la concentration la plus élevée et pour une concentration plus faible. Cette recommandation s'applique aux récipients des deux générations. Dans les cristallisoirs de la cage d'élevage, seule l'eau sus-jacente est analysée, car c'est avec elle que les amas d'œufs entrent en contact (pour le protocole avec sédiment chargé, une confirmation analytique de la concentration sédimentaire peut être envisagée). Si cela est jugé nécessaire, d'autres mesures concernant le sédiment, l'eau interstitielle et l'eau sus-jacente peuvent être effectuées au cours de l'essai. La concentration de la substance d'essai nous renseigne sur le comportement et la répartition de la substance d'essai dans le système eau-sédiment. Des échantillons de sédiment et d'eau interstitielle devant être prélevés au début et au cours de l'essai (voir paragraphe 39), on prévoira des récipients expérimentaux supplémentaires afin de réaliser les déterminations analytiques. Il n'est pas forcément nécessaire d'analyser le sédiment dans

▼M6

le protocole avec eau chargée si la répartition de la substance chimique d'essai entre l'eau et le sédiment a été clairement déterminée par une étude eau/sédiment menée dans des conditions comparables (par exemple, rapport sédiment/eau, type d'application, teneur en carbone organique du sédiment), ou si les concentrations mesurées dans l'eau sus-jacente restent comprises entre 80 et 120 % des valeurs nominales ou mesurées initialement.

39. Lorsqu'on effectue des mesures intermédiaires (par exemple au $7^{ème}$ et/ou $14^{ème}$ jour) et si l'analyse requiert des échantillons volumineux qui ne peuvent être prélevés des récipients sans influencer le système expérimental, les analyses seront pratiquées sur des échantillons provenant de récipients expérimentaux supplémentaires traités de la même façon (y compris par la présence des organismes d'expérience), mais non utilisés pour les observations biologiques.

40. Pour isoler l'eau interstitielle, il est recommandé de centrifuger les échantillons à 10 000 g et à 4 °C durant 30 minutes. Cependant, s'il est démontré que la substance chimique d'essai n'adsorbe pas sur les filtres, la filtration est également acceptable. Avec des échantillons trop petits, il arrive que les concentrations dans l'eau interstitielle soient impossibles à analyser.

Paramètres physico-chimiques

41. Le pH, l'oxygène dissous dans l'eau d'essai et la température de l'eau dans les récipients expérimentaux et les cristallisoirs sont mesurés de façon appropriée (voir paragraphe 10). La dureté de l'eau et sa teneur en ammoniac sont mesurées dans les récipients témoins ainsi que dans un récipient d'essai et un cristallisoir à la concentration la plus élevée, au début et à la fin de l'essai.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

42. Cet essai sur le cycle de vie a pour objet de déterminer l'effet de la substance chimique d'essai sur la reproduction et, pour deux générations, sur la vitesse de développement et le nombre total de moucherons mâles et femelles vivants complètement émergés. Pour déterminer le taux d'émergence, il faut rassembler les données concernant les mâles et les femelles. S'il n'existe pas de différence de sensibilité statistiquement significative entre les deux sexes en matière de vitesse de développement, les résultats mâles et femelles pourront être mis en commun à des fins d'analyse statistique.

43. Il est d'usage de calculer les concentrations efficaces, exprimées en concentrations dans l'eau sus- jacente (pour l'eau chargée) ou dans le sédiment (pour le sédiment chargé), en fonction des concentrations mesurées au début de l'exposition (voir paragraphe 38). Ainsi, en ce qui concerne l'eau chargée, on effectue habituellement pour chaque traitement une moyenne des concentrations initialement mesurées dans l'eau sus-jacente des récipients des deux générations et de celles des cristallisoirs. En ce qui concerne les sédiments chargés, on effectue habituellement pour chaque traitement une moyenne des concentrations initialement mesurées dans les sédiments des récipients des deux générations (et éventuellement de celles des cristallisoirs).

44. Pour calculer une estimation ponctuelle, c'est-à-dire une CE_x, les statistiques par récipient et par cage d'élevage peuvent être utilisées comme réplicats vrais. Pour calculer un intervalle de confiance pour une CE_x quelconque, il faut tenir compte de la variabilité entre les récipients, ou démontrer que celle-ci est négligeable. Si le modèle est ajusté par la méthode des moindres carrés, il convient de transformer les statistiques par récipient afin d'accroître l'homogénéité de la variance. Toutefois, les valeurs de la CE_x sont à calculer après que les résultats ont été transformés à nouveau de façon à recouvrer la valeur d'origine

▼**M6**

45. Si l'analyse statistique vise à déterminer la CSEO par un test d'hypothèse, il est nécessaire de prendre en compte la variabilité entre les récipients, ce que garantissent les méthodes d'analyse de la variance (procédures de Williams et Dunnett par exemple). Le test de Williams est approprié lorsque la relation dose-effet est supposée être monotone en théorie, tandis que le test de Dunnett convient si l'hypothèse de la monotonie ne tient pas. En revanche, des tests plus robustes (27) peuvent être utilisés au cas où les hypothèses habituelles de l'analyse de variance (ANOVA) ne se vérifient pas (31).

Taux d'émergence

46. Les données relatives au taux d'émergence sont des données quantales, qui peuvent être analysées par le test de Cochran-Armitage appliqué de façon régressive si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Dans le cas contraire, un test exact de Fisher ou un test de Mantel-Haentzal avec des valeurs de p corrigées selon Bonferroni-Holm peuvent être employés. S'il s'avère que la variabilité entre réplicats à la même concentration est supérieure à ce qu'une distribution binomiale indiquerait (variation souvent qualifiée d'«extra-binomiale»), on appliquera un test plus robuste (Cochran-Armitage ou test exact de Fisher) comme proposé à la référence (27).

La somme des moucherons (mâles et femelles) vivants émergés par récipient, n_e, est déterminée et divisée par le nombre de larves introduites, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

Où:

TE = Taux d'émergence

n_e = nombre de moucherons vivants émergés par récipient

n_a = nombre de larves introduites par récipient (normalement 20)

Lorsque n_e est supérieur à n_a (c'est-à-dire lorsqu'involontairement, un nombre de larves plus important que prévu a été introduit), n_a doit être augmenté pour être égal à n_e.

47. Une autre approche plus appropriée aux échantillons de grande taille, lorsque la variance est extra-binomiale, consiste à traiter le taux d'émergence comme une réponse continue et à appliquer une méthode cohérente avec ces données du *TE*. On considère ici qu'un échantillon est de grande taille lorsque le nombre de moucherons émergés et le nombre de chironomes non émergés sont tous deux supérieurs à cinq par (récipient de) réplicat.

48. Avant d'appliquer l'analyse de variance (ANOVA), il faut d'abord transformer les valeurs du *TE* par arcsinus-racine carrée ou selon Tukey-Freeman, afin d'obtenir une distribution proche de la normale et d'égaliser les variances. Le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction selon Bonferroni) ou le test de Mantel-Haentzal peuvent être employés lorsqu'on utilise les fréquences absolues. La transformation arcsinus-racine carrée consiste à calculer le sinus inverse (sinus^{-1}) de la racine carrée du *TE*.

49. Pour les taux d'émergence, les valeurs de la CE_x sont calculées au moyen d'une analyse de régression [modèles probit, logit ou Weibull (28), par exemple]. Si l'analyse de régression échoue (par exemple, lorsqu'il y a moins de deux réponses partielles), on fait appel à d'autres méthodes non paramétriques telles que la moyenne mobile ou l'interpolation simple.

Vitesse de développement

50. La période moyenne de développement correspond au temps moyen écoulé entre l'introduction des larves (jour 0 de l'essai) et l'émergence de la cohorte expérimentale de moucherons (pour calculer la période

▼**M6**

réelle de développement, il faut tenir compte de l'âge des larves au moment de l'introduction). La vitesse de développement est l'inverse de la période de développement (unité: 1/jour) et correspond à la portion de développement larvaire qui s'effectue par jour. Pour évaluer la toxicité dans les sédiments, il est préférable de choisir la vitesse de développement car sa variance est plus faible et ses valeurs sont plus homogènes et plus proches d'une distribution normale, en comparaison avec la période de développement. C'est pourquoi des tests paramétriques plus puissants conviennent mieux à la vitesse de développement qu'à la période de développement. Si la vitesse de développement est traitée comme une réponse continue, les valeurs de la CE_x peuvent être estimées par une analyse de régression [voir (29) (30)]. Les méthodes d'analyse de la variance (ANOVA), telles que les essais de Williams ou Dunnett, permettent de déterminer une CSEO pour la vitesse moyenne de développement. Les moucherons mâles émergeant plus tôt que les femelles, et présentant donc une vitesse de développement plus rapide, il est pertinent de calculer la vitesse de développement de chacun des sexes, en plus de celle de l'ensemble des moucherons.

51. Pour les tests statistiques, les moucherons observés le jour x sont considérés comme ayant émergé au milieu de l'intervalle de temps compris entre le jour x et le jour x – 1 (1 = longueur de l'intervalle d'observation, habituellement 1 jour). La vitesse de développement moyenne par récipient ($\overline{x}$) est calculée comme suit:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i X_i}{n_e}$$

Où:

$\overline{x}$: vitesse de développement moyenne par récipient

i: indice de l'intervalle d'observation

m: nombre maximal d'intervalles d'observation

f_i: nombre de moucherons émergés durant l'intervalle d'observation i

n_e: nombre total de moucherons émergés à la fin de l'expérience (Σf_i)

x_i: vitesse de développement des moucherons émergés durant l'intervalle i

$$x_i = 1/\text{jour}_i - \frac{l_i}{2}$$

Où:

jour_i: jour d'observation (nombre de jours depuis l'introduction des larves)

l_i: longueur de l'intervalle d'observation i (exprimée en jours, habituellement 1 jour)

Sex ratio

52. Les données relatives au sex-ratio sont des données quantales qui doivent donc être évaluées au moyen d'un test exact de Fisher ou d'autres méthodes appropriées. Le sex-ratio naturel de *C. riparius* est de un, c'est-à-dire que le nombre de mâles est égal au nombre de femelles. Le sex-ratio doit être calculé de la même manière pour les deux générations. Le nombre maximum de moucherons par récipient (soit 20) étant trop faible pour permettre des analyses statistiques significatives, on additionnera le nombre total de moucherons complètement émergés et vivants de

▼M6

chaque sexe dans tous les récipients d'un même traitement. Ces données brutes sont comparées au témoin (solvant) ou aux résultats des témoins groupés dans un tableau à double entrée (2 × 2).

Reproduction

53. La reproduction, tout comme la fécondité, est calculée comme le nombre d'amas d'œufs par femelle. Plus précisément, le nombre total d'amas d'œufs produits dans une cage d'élevage est divisé par le nombre total de femelles vivantes et en bonne santé introduites dans cette cage. Il est possible de déterminer une CSEO pour la fécondité en utilisant des méthodes d'analyse de variance (ANOVA) telles que le test de Williams ou de Dunnett.

54. La fertilité des amas d'œufs sert à quantifier le nombre d'amas fertiles par femelle. Le nombre total d'amas fertiles produits dans une cage d'élevage est divisé par le nombre total de femelles vivantes et en bonne santé introduites dans cette cage. Il est possible de déterminer une CSEO pour la fertilité en utilisant des méthodes d'analyse de variance (ANOVA) telles que le test de Williams ou de Dunnett.

Rapport d'essai

55. Le rapport d'essai doit fournir les informations suivantes:

Substance d'essai

— état physique et propriétés physico-chimiques [par exemple, hydrosolubilité, pression de vapeur, log K_{oe}, coefficient de partage dans le sol (ou dans le sédiment s'il est connu), stabilité dans l'eau et dans le sédiment, etc.];

— identification chimique (nom courant, nom chimique, formule structurale, numéro CAS, etc.), pureté et méthode analytique de dosage de la substance d'essai.

Espèces d'essai:

— organismes utilisés pour l'essai: espèce, nom scientifique, source et conditions d'élevage;

— informations sur la manipulation des amas d'œufs et des larves;

— informations sur la manipulation des adultes émergés de la 1ère génération à l'aide d'un extracteur ou autre appareil (voir Appendice 5);

— âge des organismes d'essai au moment de leur introduction dans les récipients expérimentaux de la 1ère et de la 2ème générations.

Conditions de l'essai:

— sédiment utilisé, c'est-à-dire naturel ou reconstitué (artificiel);

— pour les sédiments naturels: localisation et description du site de prélèvement avec, si possible, son historique de contamination; caractéristiques du sédiment: pH, teneur en carbone organique, rapport C/N et granulométrie (s'il y a lieu);

— pour les sédiments reconstitués: préparation, ingrédients et caractéristiques (teneur en carbone organique, pH, humidité, etc. mesurés au début de l'essai);

— préparation de l'eau d'essai (si l'eau est reconstituée) et caractéristiques (concentration d'oxygène, pH, dureté, etc. mesurés au début de l'essai);

▼**M6**

— profondeur du sédiment et de l'eau sus-jacente dans les récipients expérimentaux et les cristallisoirs;

— volume d'eau sus-jacente et d'eau interstitielle; poids du sédiment humide avec et sans eau interstitielle dans les récipients expérimentaux et les cristallisoirs;

— récipients expérimentaux (matériau et dimension);

— cristallisoirs (matériau et dimension);

— cages d'élevage (matériau et dimension);

— méthode de préparation des solutions-mères et concentrations d'essai pour les récipients expérimentaux et les cristallisoirs;

— application de la substance d'essai dans les récipients d'essai et les cristallisoirs: concentrations d'essai, nombre de réplicats et solvants, si nécessaire;

— conditions d'incubation des récipients d'essai: température, cycle et intensité de lumière, aération (nombre de bulles par seconde);

— conditions d'incubation pour les cages d'élevage et les cristallisoirs: température, cycle et intensité de lumière;

— conditions d'incubation pour les amas d'œufs dans les plaques de microtitration (ou autres récipients): température, cycle et intensité de lumière;

— informations détaillées sur la nourriture, notamment: type, préparation, quantité et régime d'administration.

Résultats:

— concentrations d'essai nominales, concentrations d'essai mesurées et résultats de toutes les analyses conduites pour déterminer la concentration de la substance d'essai dans les récipients expérimentaux et les cristallisoirs;

— qualité de l'eau dans les récipients expérimentaux et les cristallisoirs: pH, température, oxygène dissous, dureté et teneur en ammoniac;

— remplacement de l'eau d'essai évaporée dans les récipients expérimentaux, le cas échéant;

— nombre de moucherons mâles et femelles émergés par récipient et par jour pour la 1ère et la 2ème générations;

— sex-ratio des moucherons entièrement émergés et vivants par traitement pour la 1ère et la 2ème générations;

— nombre de larves non émergées sous la forme de moucherons par récipient pour la 1ère et la 2ème génération;

— pourcentage/fraction d'émergence par réplicat et concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucherons mâles et femelles) pour la 1ère et la 2ème génération;

— vitesse moyenne de développement des moucherons entièrement émergés et vivants par réplicat et par concentration d'essai (résultats séparés pour les moucherons mâles et femelles, ainsi que résultats regroupés) pour la 1ère et la 2ème génération;

— nombre d'amas d'œufs déposés dans les cristallisoirs par cage d'élevage et par jour;

▼**M6**

— caractéristiques de chaque amas d'œufs (taille, forme et fertilité);

— fécondité — nombre total d'amas d'œufs sur nombre total de femelles introduites dans la cage d'élevage;

— fertilité — nombre total d'amas fertiles sur nombre total de femelles introduites dans la cage d'élevage;

— estimation des effets toxiques observés, par exemple CE_x (et intervalles de confiance associés), CSEO et méthodes statistiques employées pour la déterminer;

— discussion des résultats, notamment influence éventuelle sur les résultats de l'essai d'écarts par rapport à cette Ligne directrice.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Chapitre C.28 de la présente annexe, Essi de toxicité sur les chironomes dans un système eau chargée-sédiment.

(2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. and M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus* (*Camptochironomus*) *tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). Entomologica Scandinavica, 30: 311-322.

(3) Fleming, R. *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, Document de l'atelier sur l'évaluation de la toxicité des sédiments (WOSTA) tenu aux Pays-Bas.

(5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards. Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(6) Environnement Canada (1997), Essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (*Chironomus tentans* ou *Chironomus riparius*) dans les sédiments, Méthode d'essai biologique, Rapport SPE 1/RM/32, Décembre 1997.

(7) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment- associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Deuxième édition, EPA 600/R-99/064. Mars 2000, Révision de la première édition (datant de juin 1994).

(8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.

(10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. et R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.

(11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. and C.D. Rowland (2006), Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, Environ. Toxicol. Chem., 25: 2662-2674.

▼**M6**

(12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. and L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, Ecotoxicology, 16: 221-230.

(13) Sugaya, Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui,* Jp. J. Sanit. Zool., 48: 345-350.

(14) Kawai, K. (1986), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), Jp. J. Sanit. Zool., 37: 47-57.

(15) Chapitre C.27 de la présente annexe, Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau-sédiment chargé.

(16) OCDE (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Publications de l'OCDE sur l'environnement, la santé et la sécurité, Série de l'OCDE sur les essais et l'évaluations n° 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OCDE, Paris.

(17) Weltje, L., Rufli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. and M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, Integr. Environ. Assess. Management.

(18) Environnement Canada. (1995), Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité au moyen de sédiments de contrôle dopés avec un produit toxique de référence. Rapport SPE 1/RM/30, Septembre 1995.

(19) Oetken, M, Nentwig, G., Löffler, D, Ternes, T. et J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 49: 353-361.

(20) Suedel, B.C. et J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, Environ. Toxicol. Chem., 13: 1163-1175.

(21) Naylor, C. and C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, Chemosphere, 31: 3291-3303.

(22) Dunnett, C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.

(23) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, 20: 482-491.

(24) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(25) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

(26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. and H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. J Soils Sediments, 9: 94-102.

(27) Rao, J.N.K. et A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics, 48: 577-585.

(28) Christensen, E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, Water Res, 18: 213-221.

▼**M6**

(29) Bruce, R.D. and D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environ. Toxicol. Chem., 11: 1485-1494.

(30) Slob, W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66: 298-312.

(31) OCDE (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement, Série sur les essais et l'évaluation, Document d'orientation de l'OCDE n° 54, 146 pp., ENV/JM/MONO(2006)18, OCDE, Paris.

(32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. et G.T. Ankley (1997), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, Environ. Toxicol. Chem., 16: 1165-1176.

(33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. and J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) — baseline experiments for future multi-generation studies, J. Environ. Sci. Health Part A, 42: 1-9.

(34) OCDE (2010), Validation *report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Publication prochaîne dans la série sur les essais et l'évaluation, OCDE, Paris.

▼**M6**

Appendice 1

Définitions

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente méthode d'essai:

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Sédiment reconstitué, artificiel ou synthétique: mélange de matériaux utilisés pour reproduire au mieux les composants physiques d'un sédiment naturel.

Eau sus-jacente: eau surmontant le sédiment dans le récipient expérimental.

Eau interstitielle, ou eau des pores: eau qui occupe l'espace entre le sédiment et les particules de sol.

Eau chargée: eau d'essai à laquelle a été ajoutée la substance d'essai.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼M6

Appendice 2

Recommandations pour la culture de *Chironomus riparius*

1. Les larves de *Chironomus* peuvent être élevées dans des cristallisoirs ou de grands récipients. Du sable quartzique fin est déposé en couche mince (environ 5 à 10 mm d'épaisseur) au fond du récipient. Le Kieselguhr (par exemple l'art. 8117 de Merck) convient aussi comme substrat (une couche encore plus mince de quelques millimètres à peine suffit). Une eau de qualité appropriée, profonde de plusieurs centimètres, vient ensuite recouvrir le substrat. En cas d'évaporation, le niveau d'eau doit toujours être ramené à sa hauteur initiale, afin de prévenir toute dessiccation. L'eau peut être remplacée si nécessaire. Une légère aération est fournie. Les récipients d'élevage des larves doivent être placés dans des cages appropriées, afin d'empêcher la fuite des adultes émergeant. La cage sera suffisamment grande pour permettre aux adultes émergés d'essaimer, sans quoi la copulation risque de ne pas avoir lieu (dimensions minimales: 30 × 30 × 30 cm).

2. Les cages sont gardées à température ambiante, ou à 20 ± 2 °C si elles sont placées dans une chambre à ambiance constante, avec une photopériode de 16 heures de lumière (intensité: environ 1 000 lux) et 8 heures d'obscurité. Une humidité relative de l'air inférieure à 60 % serait susceptible d'empêcher la reproduction.

Eau de dilution

3. Toute eau naturelle ou reconstituée appropriée peut être utilisée. De l'eau de puits, de l'eau du robinet déchlorée et un milieu artificiel (Elendt «M4» ou «M7», voir ci-après) sont souvent utilisés. L'eau est aérée avant l'emploi. Si nécessaire, on peut renouveler l'eau de culture en versant ou en siphonnant soigneusement l'eau usée des récipients expérimentaux, sans détruire les tubes larvaires.

Alimentation des larves

4. Les larves de *Chironomus* reçoivent des paillettes pour poissons (Tetra Min®, Tetra Phyll® ou une autre marque déposée équivalente), à raison d'environ 250 mg par récipient et par jour. Cette nourriture peut être administrée sous la forme d'une poudre moulue à sec ou d'une suspension dans l'eau: 1,0 g de paillettes ajoutées à 20 ml d'eau de dilution et agitées de façon à obtenir un mélange homogène. Cette préparation peut être administrée à raison d'environ 5 ml par récipient et par jour (agiter avant emploi). Les larves plus âgées peuvent en recevoir plus.

5. La nourriture est ajustée en fonction de la qualité de l'eau. Si le milieu de culture devient trouble, il convient de réduire la ration. Les quantités de nourriture données sont soigneusement notées. Une insuffisance de nourriture fera émigrer les larves vers la colonne d'eau, tandis qu'un excès de nourriture intensifiera l'activité microbienne et abaissera la concentration d'oxygène. Ces deux conditions sont susceptibles de ralentir la croissance des organismes.

6. Certaines cellules d'algues vertes (*Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*, par exemple) peuvent aussi être ajoutées lors de la préparation de nouveaux récipients de culture.

Alimentation des adultes émergents

7. Certains expérimentateurs ont suggéré de nourrir les adultes émergés au moyen d'un tampon d'ouate imbibé d'une solution de sucrose saturée.

▼M6

Émergence

8. À 20 ± 2 °C, les adultes commencent à émerger des récipients d'élevage des larves après environ 13 à 15 jours. Les mâles sont faciles à identifier grâce à leurs antennes plumeuses et leur corps fin.

Amas d'œufs

9. Dès que des adultes sont présents dans la cage d'élevage, il faut vérifier trois fois par semaine, dans tous les récipients d'élevage de larves, si des amas d'œufs gélatineux ont été déposés. Si tel est le cas, les amas d'œufs doivent être soigneusement enlevés et transférés dans un petit récipient contenant un échantillon de l'eau d'élevage. Les amas d'œufs servent à préparer un nouveau récipient de culture (2 à 4 amas d'œufs par récipient, par exemple) ou à pratiquer des essais de toxicité.

10. Les larves du premier stade devraient éclore après 2-3 jours.

Préparation de nouveaux récipients de culture

11. Une fois que les cultures ont été lancées, il devrait être possible de préparer un nouveau récipient de culture de larves, une fois par semaine ou moins souvent, suivant les besoins de l'essai, et de retirer les récipients plus anciens après l'émergence des moucherons adultes. Ce système permet d'obtenir régulièrement un contingent d'adultes, avec une organisation minimale.

Préparation des solutions d'essai «M4» et «M7»

12. Elendt (1990) a décrit le milieu «M4». Le milieu «M7» est préparé comme le milieu «M4», sauf pour les substances indiquées au tableau 1, dont les concentrations sont quatre fois plus faibles dans le milieu «M7» que dans le milieu «M4». La solution d'essai ne doit pas être préparée selon les instructions d'Elendt et Bias (1990), car les concentrations de $NaSiO_3 \cdot 5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 et K_2HPO_4 indiquées pour la préparation des solutions-mères ne conviennent pas.

Préparation du milieu «M7»

13. Chaque solution-mère (I) est préparée séparément et une solution-mère combinée (II) est préparée à partir de ces solutions-mères (I) (voir tableau 1). Cinquante millilitres de la solution-mère combinée (II), additionnés de la quantité de chaque solution-mère de macronutriments indiquée au tableau 2, sont amenés à 1 litre avec de l'eau désionisée pour composer le milieu «M7». On prépare une solution-mère de vitamines en ajoutant trois vitamines à de l'eau désionisée, comme indiqué au tableau 3, et l'on verse 0,1 ml de la solution-mère combinée de vitamines au milieu «M7» final, peu avant l'emploi (la solution-mère de vitamines est stockée congelée par petites aliquotes). Le milieu est aéré et stabilisé.

Tableau 1

Solutions-mères d'éléments en traces pour les milieux M4 et M7

Solutions-mères (I)	Quantité (mg) pour former une solution de 1 litre avec de l'eau désionisée	Pour préparer la solution-mère (II): mélanger les quantités suivantes (ml) de solutions-mères (I) et compléter à un litre avec de l'eau désionisée		Concentrations finales dans les solutions expérimentales (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M6**

Solutions-mères (I)	Quantité (mg) pour former une solution de 1 litre avec de l'eau désionisée	Pour préparer la solution-mère (II): mélanger les quantités suivantes (ml) de solutions-mères (I) et compléter à un litre avec de l'eau désionisée		Concentrations finales dans les solutions expérimentales (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Ces substances sont dosées différemment dans M4 et M7, comme indiqué plus haut.
(2) Ces solutions sont préparées séparément, puis mélangées et autoclavées immédiatement après.

Tableau 2

Solutions-mères de macronutriments pour les milieux M4 et M7

	Quantité pour former une solution de 1 litre avec de l'eau désionisée (mg)	Quantités de solutions-mères de macronutriments ajoutées pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions expérimentales M4 et M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M6**

Tableau 3

Solution-mère de vitamines pour les milieux M4 et M7

Les trois solutions de vitamines sont mélangées de façon à former une solution-mère de vitamines.

	Quantité pour former une solution de 1 litre avec de l'eau désionisée (mg)	Quantités de solutions-mères de macronutriments ajoutées pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions expérimentales M4 et M7 (mg/l)
Hydrochlorure de thiamine	750	0,1	0,075
Cyanocobalamine (B12)	10	0,1	0,0010
Biotine	7,5	0,1	0,00075

RÉFÉRENCES

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Édité par M. Streloke et H. Köpp. Berlin.

Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, Protoplasma, 154: 25-33.

Elendt, B.P. and W.-R. Bias (1990), Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna*, Water Research, 24: 1157-1167.

▼**M6**

Appendice 3

Préparation du sédiment reconstitué

COMPOSITION DU SÉDIMENT

Le sédiment est reconstitué comme suit:

Ingrédient	Caractéristiques	% du sédiment poids sec
Tourbe	Tourbe à sphaigne, pH aussi proche que possible de 5,5-6,0, pas de résidus de plantes visibles, finement broyée (particules ≤ 1 mm) et séchée à l'air	4 - 5
Sable quartzique	Granulométrie: plus de 50 % des particules mesurent entre 50 et 200 µm	75 - 76
Argile kaolinique	Taux de kaolinite ≥ 30 %	20
Carbone organique	Ajusté par l'addition de tourbe et de sable	2 (± 0,5)
Carbonate de calcium	$CaCO_3$, pulvérisé, chimiquement pur	0,05 - 0,1
Eau	Conductivité ≤ 10 µS/cm	30 - 50

PRÉPARATION

La tourbe est séchée à l'air et broyée en poudre fine. Une suspension de la quantité requise de poudre de tourbe dans de l'eau désionisée est préparée à l'aide d'un homogénéisateur à haute performance. Le pH de cette suspension est ajusté à 5,5 ± 0,5 avec du $CaCO_3$. On conditionne la suspension durant au moins deux jours en l'agitant doucement à 20 ± 2 °C, afin de stabiliser le pH et d'établir une flore microbienne stable. On vérifie à nouveau le pH, qui doit atteindre 6,0 ± 0,5. Puis la suspension de tourbe est mélangée avec les autres ingrédients (sable et argile kaolinique) et de l'eau désionisée pour former un sédiment homogène dont la teneur en eau est comprise entre 30 et 50 % du poids sec du sédiment. Le pH du mélange final est à nouveau mesuré et ajusté à 6,5-7,5 avec du $CaCO_3$, si nécessaire. On prélève des échantillons de sédiment afin de déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique. Il est ensuite recommandé, avant d'utiliser le sédiment reconstitué dans l'essai de toxicité sur les chironomes, de le conditionner durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui régneront durant l'essai subséquent.

STOCKAGE

Les ingrédients secs destinés à la préparation du sédiment artificiel peuvent être entreposés dans un endroit sec et frais, à température ambiante. Le sédiment reconstitué (humide) n'est pas stocké avant son utilisation dans l'essai. Il est utilisé immédiatement après la période de conditionnement de sept jours qui achève sa préparation.

RÉFÉRENCES

OCDE (1984), *Ver de terre, essais de toxicité aiguë*, Ligne directrice N° 207, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. et B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (Oligochaeta) in artificial media, Ecotox. Environ. Safety, 39: 10-20.

▼**M6**

Appendice 4

Caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable

CONSTITUANT	CONCENTRATIONS
Particules	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Dureté en $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	< 50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux plus biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

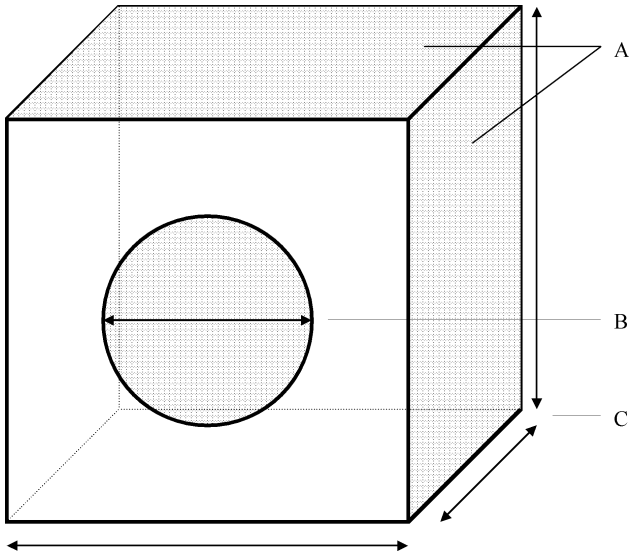
(*) Néanmoins, il est à noter que si l'on suspecte une interaction entre les ions de dureté et la substance chimique d'essai, il conviendra d'utiliser une eau moins dure (auquel cas le milieu Elendt M4 ne pourra pas être utilisé).

▼**M6**

Appendice 5

Conseils pour la réalisation de l'essai

Exemple de cage d'élevage:



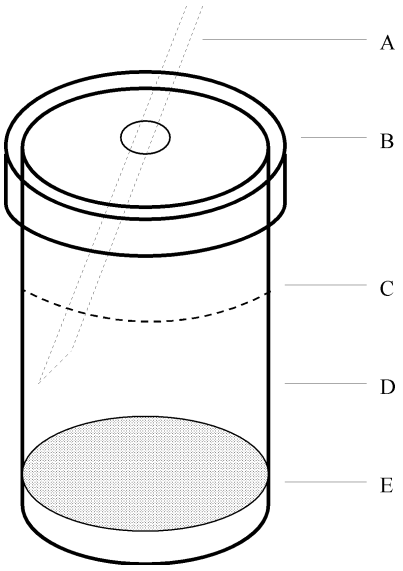
A: gaze sur le dessus et au moins un côté de la cage (maillage environ 1 mm)

B: ouverture permettant d'introduire les adultes émergés à l'intérieur de la cage et de retirer les amas d'œufs des cristallisoirs (non représentés sur ce schéma)

C: taille minimale de la cage d'élevage: 30 cm de longueur, 30 cm de hauteur et 30 cm de profondeur

▼**M6**

Exemple de récipient expérimental:



A: pipette Pasteur permettant d'aérer l'eau sus-jacente

B: couvercle en verre empêchant les moucherons de s'échapper

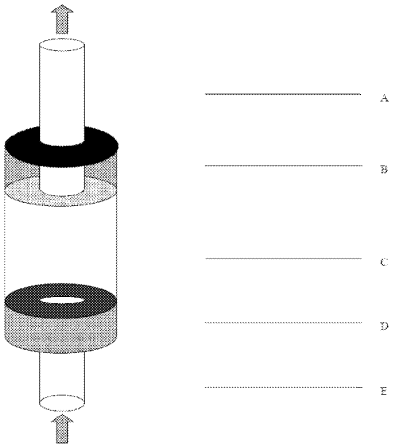
C: surface de la couche d'eau

D: récipient expérimental (bécher en verre d'une contenance minimum de 600 ml)

E: couche de sédiment

▼**M6**

Exemple d'extracteur pour la capture des moucherons adultes (les flèches indiquent la direction du flux d'air):



A: tube de verre (diamètre interne environ 5 mm) relié à une pompe à amorçage automatique

B: bouchon en caoutchouc vulcanisé, transpercé d'un tube de verre (A). Face intérieure, l'ouverture du tube de verre (A) est recouverte de coton et d'une gaze (maillage environ 1 mm^2) pour empêcher d'endommager les moucherons lorsqu'ils sont aspirés dans l'extracteur

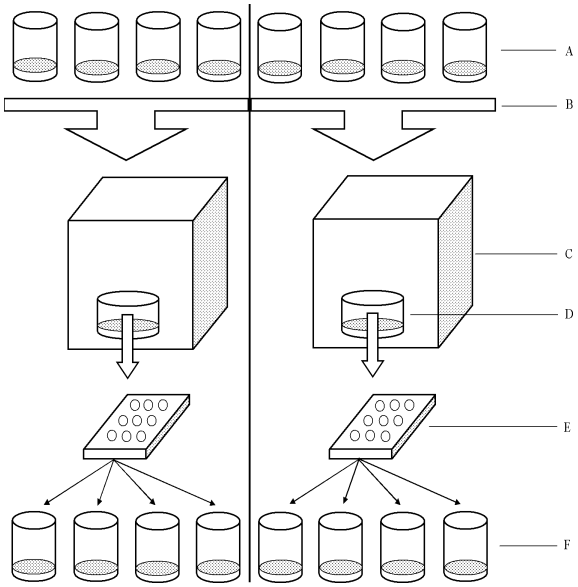
C: conteneur transparent (en plastique ou verre, longueur 15 cm environ) pour les moucherons capturés

D: bouchon en caoutchouc vulcanisé, transpercé d'un tube (E). Pour libérer les moucherons dans la cage d'élevage, retirer le bouchon D du conteneur C

E: tube (de plastique ou de verre, diamètre intérieur environ 8 mm) pour collecter les moucherons dans le récipient expérimental

▼**M6**

Présentation schématique d'un essai sur le cycle de vie:



A: 1ère génération — récipients expérimentaux contenant un système sédiment-eau, huit réplicats, 20 larves de premier stade par récipient

B: quatre récipients expérimentaux pour chaque cage d'élevage, A et B

C: cages d'élevage (A et B) pour l'essaimage, l'accouplement et la ponte

D: cristallisoirs pour le dépôt des amas d'œufs

E: plaques de microtitration, un puits par amas d'œufs

F: 2ème génération — récipients expérimentaux contenant un système sédiment-eau, huit réplicats, 20 larves de premier stade par récipient.

▼M6

C.41. **ESSAI DE DÉVELOPPEMENT SEXUEL DES POISSONS**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 234 (2011) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Elle découle d'une décision de 1998 visant à réviser les méthodes d'essai existantes ou à en élaborer de nouvelles concernant les essais de dépistage et les essais plus poussés de perturbateurs endocriniens potentiels. L'essai de développement sexuel des poissons (EDSP) a été identifié comme une méthode d'essai prometteuse couvrant un stade de la vie sensible chez les poissons et réceptif à la fois aux œstrogènes et aux androgènes. De 2006 à 2010, cette méthode d'essai a fait l'objet d'un programme de validation inter-laboratoires qui a permis la validation du medaka japonais (*Oryzias latipes*), du poisson-zèbre (*Danio rerio*) et de l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) et la validation partielle du tête-de-boule (*Pimephales promelas*) (41) (42) (43). Ce protocole inclut le medaka japonais, le poisson-zèbre et l'épinoche. Il vient, en principe, enrichir la ligne directrice 210 de l'OCDE: Poisson, Essai de Toxicité aux Premiers Stades de la Vie (1), avec une exposition maintenue jusqu'à la différenciation sexuelle des poissons, soit pendant les quelque 60 jours qui suivent l'éclosion pour le medaka japonais, l'épinoche et le poisson-zèbre (la période d'exposition peut être plus courte ou plus longue pour d'autres espèces validées ultérieurement), et avec l'ajout des effets observés sur le système endocrinien. L'EDSP évalue les effets aux premiers stades de la vie et les effets néfastes possibles de perturbateurs endocriniens potentiels (œstrogènes, androgènes et inhibiteurs de la stéroïdogenèse, par exemple) sur le développement sexuel. La combinaison des deux principaux effets observés sur le système endocrinien, la concentration de vitellogénine (VTG) et le ratio mâles/femelles phénotypique, permet à l'essai d'indiquer le mode d'action de la substance chimique d'essai. Étant donné que les évolutions du ratio mâles/femelles sont caractéristiques d'une population donnée, l'EDSP peut être utilisé pour l'évaluation des dangers et des risques. Cependant, si le test est utilisé à des fins d'évaluation des dangers et des risques, l'épinoche ne devrait pas être utilisée car les données de validation disponibles à ce jour ont montré que chez cette espèce les altérations du ratio mâles/femelles phénotypiques sont atypiques.

2. Ce protocole s'appuie sur l'exposition de poissons exposés via de l'eau à des substances chimiques durant la période sexuelle labile, au cours de laquelle les poissons peuvent être extrêmement sensibles aux effets des perturbateurs endocriniens qui interfèrent dans le développement sexuel. Deux effets principaux sont mesurés pour indiquer les aberrations du développement liées au système endocrinien, les concentrations de VTG et les ratios mâles/femelles déterminés via l'histologie gonadique. L'histopathologie gonadique (évaluation et classement par stade des ovocytes et des cellules spermatogénétiques) est optionnelle. De plus, le sexe génétique est déterminé si possible (chez le medaka japonais et l'épinoche, par exemple). La présence d'un marqueur du sexe génétique présente un avantage considérable car elle permet d'améliorer la puissance statistique des effets mesurés sur le ratio mâles/femelles et permet la détection du changement de sexe phénotypique chez chaque individu. Les autres effets apicaux à mesurer sont le taux d'éclosion, la survie, la longueur et le poids corporel. On pourrait envisager d'adapter cette méthode d'essai à d'autres espèces que celles mentionnées précédemment à condition que ces autres espèces fassent l'objet d'une validation équivalente à celle effectuée pour le medaka japonais, l'épinoche et le poisson-zèbre, que les poissons témoins soient sexuellement différenciés à la fin de l'essai, que les niveaux de VTG soient suffisamment élevés pour que l'on puisse détecter des variations significatives dues à la substance, et que la sensibilité du système expérimental soit établie par le biais de perturbateurs endocriniens de référence [(anti)-œstrogènes, (anti)-androgènes, inhibiteurs de l'aromatase, etc.]. De plus, il convient que tout rapport de validation faisant référence à des données de l'EDSP utilisant d'autres espèces soit examiné par l'OCDE, et que le résultat de la validation soit considéré comme satisfaisant.

▼M6

Remarques prémiminaires et limites de l'essai

3. La VTG est normalement produite par le foie des femelles vertébrées ovipares en réponse à la circulation d'œstrogènes endogènes (2). Il s'agit d'un précurseur des protéines du vitellus, produit par le foie puis acheminé par le sang vers les ovaires, où il est capté et modifié par les ovocytes en croissance. La synthèse de la VTG est très limitée, quoique détectable, chez les poissons immatures et les poissons mâles adultes car la circulation des œstrogènes n'y est pas suffisante. Néanmoins, le foie peut synthétiser et secréter la VTG en réponse à une stimulation œstrogénique exogène (3) (4) (5).

4. La mesure de la VTG sert à détecter les substances chimiques ayant des modes d'action œstrogéniques, anti-œstrogéniques, et androgéniques, ainsi que les substances qui interfèrent dans la stéroïdogenèse, telles que les inhibiteurs de l'aromatase. Cette détection peut se faire par la mesure de l'induction de VTG chez les poissons mâles; elle a fait l'objet de nombreuses publications scientifiques dans des revues à comité de lecture. L'induction de VTG a également été démontrée suite à une exposition à des androgènes aromatisables (6) (7). La diminution du taux d'œstrogènes circulants chez les femelles sous l'effet, par exemple, de l'inhibition de l'aromatase, l'enzyme permettant de convertir l'androgène endogène en œstrogène naturel (17β-œstradiol), engendre une diminution du niveau de VTG utilisée pour détecter les substances dont les propriétés inhibent l'aromatase ou, plus largement, les inhibiteurs de la stéroïdogenèse (33). La pertinence biologique de la réponse donnée par la VTG suite à l'inhibition des œstrogènes/de l'aromatase est établie et a été abondamment étudiée (8) (9). Néanmoins la production de VTG chez les femelles peut également être affectée par une toxicité générale et des modes d'action toxiques non- endocriniens.

5. Plusieurs méthodes de mesure ont été développées avec succès et normalisées en vue d'essais de routine pour quantifier la VTG dans le sang, le foie, des échantillons d'homogénats de l'ensemble du corps ou de tête-queue prélevés individuellement sur des poissons. C'est le cas du poisson-zèbre, de l'épinoche, du medaka japonais, du tête-de-boule, une espèce partiellement validée, pour lesquels les méthodes ELISA (procédé immunochimique d'absorption enzymatique) utilisant l'immunochimie pour la quantification de la VTG sont disponibles (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Chez le medaka japonais et le poisson-zèbre, il existe une bonne corrélation entre les concentrations de VTG mesurées dans le plasma sanguin, le foie et les échantillons d'homogénats bien que les homogénats aient tendance à donner des valeurs légèrement inférieures au plasma (17) (18) (19). Les procédures recommandées pour les prélèvements effectués en vue du dosage de la VTG sont décrites dans l'Appendice 5.

6. L'évolution du ratio mâles/femelles constitue un indicateur de changement de sexe. En principe, les œstrogènes, les anti-œstrogènes, les androgènes, les anti-androgènes et les inhibiteurs de la stéroïdogenèse peuvent affecter le ratio mâles/femelles des poissons en développement (20). On a pu constater que ce changement de sexe était partiellement réversible chez le poisson-zèbre (21) suite à l'exposition à des substances de type œstrogénique, tandis qu'un changement de sexe suite à l'exposition à des substances chimiques de type androgénique est permanente (30). Le sexe est défini comme féminin, masculin, hermaphrodite (ovocytes et cellules spermatogénétiques dans une seule et même gonade) ou indifférencié chez chaque poisson via l'examen histologique des gonades. Des recommendations sont fournies dans l'Appendice 7 et dans le document d'orientation de l'OCDE Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads (22).

7. Le sexe génétique est examiné via des marqueurs génétiques lorsqu'ils existent dans une espèce de poissons donnée. Chez le medaka japonais, les gènes féminins XX ou masculins XY peuvent être détectés par réaction en chaîne par polymérase (PCR), ou le gène lié à Y du domaine DM (DMY)

▼M6

peut être analysé (DMY négatif ou positif) tel que décrit dans les documents de référence (23) (24). Pour l'épinoche, il existe une méthode de PCR équivalente pour la détermination du sexe génétique, décrite dans l'Appendice 10. Lorsque le sexe génétique peut être individuellement mis en relation avec le sexe phénotypique, l'essai est renforcé et le sexe génétique est donc être déterminé dans des espèces ayant des marqueurs du sexe génétique abondamment étudiés.

8. Les deux principaux effets mesurés sur le système endocrinien, la VTG et le ratio mâles/femelles, peuvent, s'ils sont combinés, démontrer le mode d'action de la substance chimique sur le système endocrinien (tableau 1). Le ratio mâles/femelles est un biomarqueur pertinent en terme de population (25) (26), et pour des modes d'action bien définis, les résultats de l'EDSP peuvent être utilisés pour évaluer les dangers et les risques si cela est jugé opportun par l'agence réglementaire. Ces modes d'action sont actuellement ceux des œstrogènes, androgènes et inhibiteurs de la stéroïdogenèse.

Tableau 1

réaction des effets mesurés sur le système endocrinien à différents modes d'action de substances chimiques:

↑ = augmentation,↓ = diminution, — = non recherché

Modes d'action	VTG ♂	VTG ♀	ratio mâles/femelles	Références
Agoniste faible des œstrogènes	↑	↑	↑♀ ou ↑indifférenciés	(27) (40)
Agoniste fort des œstrogènes	↑	↑	↑♀ ou ↑indifférenciés, néant ♂	(28) (40)
Antagoniste des œstrogènes	—	—	↑♀ ou ↑indifférenciés	(29)
Agoniste des androgènes	↓ ou -	↓ ou –	↑ ♂, néant ♀	(28) (30)
Antagoniste des androgènes	—	—	↑♀ ↑hermaphrodites	(31)
Inhibiteur de l'aromatase	↓	↓	↓♀	(33)

9. L'EDSP ne couvrant pas le stade de la reproduction des poissons, il convient d'évaluer les substances chimiques susceptibles d'affecter la reproduction à des concentrations plus faibles que le développement sexuel dans un essai qui couvre la reproduction.

10. Certains termes techniques utilisés dans la présente méthode d'essai sont définis dans l'Appendice 1.

11. L'essai *in vivo* de développement sexuel des poissons vise à détecter les substances chimiques ayant des propriétés androgéniques et œstrogéniques ainsi que des propriétés anti-androgéniques, anti-œstrogéniques et inhibitrices de la stéroïdogenèse. Les phases de validation (1 et 2) de l'EDSP couvraient les œstrogènes, les androgènes et les inhibiteurs de la stéroïdogenèse. Les effets des antagonistes des œstrogènes et des androgènes dans le cadre de l'EDSP sont illustrés dans le tableau 1, mais ces modes d'action font actuellement l'objet d'une littérature moins abondante

PRINCIPE DE L'ESSAI

12. Dans cet essai, les poissons sont exposés, de l'œuf nouvellement fécondé à l'achèvement de la différenciation sexuelle, à au moins trois concentrations de la substance chimique d'essai dissoute dans de l'eau. L'essai se déroule dans des conditions dynamiques à moins que la substance chimique d'essai ne le permette pas pour des raisons de disponibilité ou de nature (solubilité limitée, par exemple). Au début de l'essai, les œufs nouvellement fécondés

▼M6

(avant division du blastodisque) sont placés dans les enceintes d'essai. Le taux de charge des enceintes est décrit pour chaque espèce au paragraphe 27. Pour les espèces validées, à savoir le medaka japonais, l'épinoche et le poisson-zèbre, l'essai est terminé 60 jours après l'éclosion. À la fin de l'essai, tous les poissons sont euthanasiés sans cruauté. Un prélèvement biologique (plasma sanguin, foie ou homogénat tête-queue) est effectué sur chaque poisson pour l'analyse de la VTG, et la partie restante est fixée pour l'évaluation histologique des gonades visant à déterminer le sexe phénotypique; l'histopathologie (classement par stade des gonades, gravité de l'hermaphrodisme, par exemple) est optionnelle. Un prélèvement biologique (nageoire anale ou dorsale) pour la détermination du sexe génétique est effectué sur les espèces possédant les biomarqueurs adéquats (Appendices 9 et 10).

13. L'Appendice 2 donne une vue d'ensemble des conditions d'essai pertinentes spécifiques aux espèces validées: le medaka japonais, l'épinoche et le poisson-zèbre.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE CHIMIQUE D'ESSAI

14. Il convient que les résultats d'un essai de toxicité aiguë ou d'un autre essai de toxicité à court terme [méthode d'essai C.14 (34) et ligne directrice 210 de l'OCDE (1), par exemple], mené de préférence avec l'espèce sélectionnée pour l'essai en question, soient disponibles. Cela suppose que l'hydrosolubilité et la pression de vapeur de la substance d'essai soient connues et qu'une méthode analytique fiable de quantification de la substance chimique dans les enceintes d'essai, avec une précision et une limite de détection connues et consignées par écrit, soit disponible.

15. D'autres informations sont utiles, telles que la formule développée, la pureté de la substance chimique, la stabilité dans l'eau et à la lumière, le pKa, le P_{oe} et les résultats d'un essai de biodégradabilité facile (méthode d'essai C.4) (35).

Critères de validité de l'essai

16. Pour que les résultats de l'essai soient acceptables, les conditions sont les suivantes:

— La concentration d'oxygène dissous est maintenue à 60 pour cent au moins de la valeur de la saturation en air (VSA) pendant toute la durée de l'essai.

— À aucun moment, durant toute la période d'exposition, la température de l'eau ne diffère de plus de ± 1,5 °C entre les enceintes, et elle demeure dans la plage de température indiquée pour l'espèce étudiée (Appendice 2).

— Une méthode validée d'analyse de la substance d'exposition avec une limite de détection bien en-deçà de la plus faible concentration nominale est disponible et les données disponibles démontrent que les concentrations de substance chimique d'essai en solution ont été correctement maintenues dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées.

— Le taux global de survie des œufs fécondés dans les témoins et, le cas échéant, dans les témoins contenant le solvant, est supérieur ou égal aux limites définies à l'Appendice 2.

— Les critères de validité relatifs à la croissance et aux proportions de chaque sexe à la fin de l'essai sont basés sur les données issues des groupes témoins (témoin contenant à la fois le solvant et l'eau, à moins qu'ils présentent des différences significatives, puis uniquement le solvant):

▼M6

		Medaka japonais	Poisson-zèbre	Épinoche
Croissance	Poids frais de poissons à sec	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Longueur (longueur standard)	> 20 mm	> 14 mm	> 20 mm
Ratio mâles/femelles		30-70 %	30-70 %	30-70 %

— L'utilisation d'un solvant ne devrait pas avoir d'effet statistique significatif sur la survie, d'effets perturbateurs sur le système endocrinien ni d'autres effets néfastes sur les premiers stades de la vie comme le révèle un témoin solvant.

Si l'on observe une déviation par rapport aux critères de validité de l'essai, les conséquences sont analysées en fonction de la fiabilité des données d'essai, et ces analyses sont consignées dans le rapport d'essai.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Enceintes d'essai

17. On peut utiliser tout récipient en verre, en acier inoxydable ou en matériau chimiquement inerte. Il convient que les enceintes soient suffisamment grandes pour être en conformité avec les critères de charge donnés ci-dessous. Il est souhaitable de disposer les enceintes expérimentales selon un schéma aléatoire par bloc, chaque traitement étant présent dans chaque bloc, plutôt que de les disposer de façon aléatoire. On protège les enceintes de toute perturbation non voulue.

Choix des espèces de poisson

18. L'Appendice 2 regroupe les espèces de poissons recommandées pour cet essai. Les procédures d'inclusion de nouvelles espèces sont décrites dans le paragraphe 2.

Soins des poissons géniteurs

19. Les moyens de maintenir les poissons géniteurs dans des conditions satisfaisantes sont détaillés dans la ligne directrice 210 de l'OCDE (1). Les poissons géniteurs sont nourris une ou deux fois par jour avec des aliments appropriés.

Manipulation des embryons et des larves

20. Au départ, les embryons et les larves peuvent être exposés à l'intérieur de la cuve principale dans des récipients plus petits en verre ou en acier inoxydable avec des côtés ou des extrémités en treillis permettant à la solution d'essai de traverser le récipient. On peut créer un écoulement non turbulent à travers ces petits récipients en les suspendant à un bras disposé de façon à déplacer le récipient verticalement mais en gardant toujours les organismes submergés.

21. Quand on utilise des récipients, des grillages ou des treillis pour maintenir les œufs à l'intérieur de la cuve principale, ces dispositifs sont enlevés après l'éclosion des larves, sauf si ces treillis ont pour objectif d'éviter aux poissons de s'enfuir. Si l'on doit transférer les larves, on ne les expose pas à l'air et il ne faut pas utiliser un filet pour enlever les poissons des récipients contenant les œufs. Le moment de ce transfert varie selon les espèces et il se peut que le transfert ne soit pas nécessaire.

▼M6

Eau

22. Pour les essais, on peut utiliser toute eau dans laquelle les espèces étudiées (témoins) ont un taux de survie au moins aussi bon que dans l'eau décrite dans l'Appendice 3. Il convient que sa qualité demeure constante pendant la durée de l'essai. On prélève et analyse régulièrement des échantillons afin de s'assurer que l'eau de dilution n'influencera pas indûment le résultat des essais (par exemple par réaction avec la substance d'essai) ou n'influencera pas négativement la performance des géniteurs. Le carbone organique total, la conductivité, le pH et les matières en suspension sont dosés par exemple tous les trois mois dans le cas d'une eau de dilution de qualité relativement constante. Les métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, par exemple), les anions et cations principaux (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}, par exemple) et les pesticides sont dosés si la qualité de l'eau est discutable. L'analyse chimique et la collecte d'eau sont détaillées dans le paragraphe 34.

Solutions d'essai

23. Il convient d'utiliser un système dynamique si cela est possible d'un point de vue pratique. Les essais en dynamique nécessitent un système qui délivre et dilue de façon continue une solution-mère de la substance chimique d'essai (par exemple une pompe doseuse, un dilueur proportionnel, un système de saturation) afin de distribuer une série de concentrations vers les enceintes d'essai. Pendant l'essai, on vérifie à intervalles réguliers les débits des solutions-mères et de l'eau de dilution; ceux-ci ne doivent pas varier de plus de 10 % pendant toute la durée de l'essai. Un débit équivalent à au moins cinq fois le volume de l'enceinte d'essai par 24 heures s'est révélé adéquat (1). Il faut veiller à éviter l'utilisation de tubes en plastique ou d'autres types de matériel pouvant contenir des substances biologiquement actives ou adsorber la substance chimique d'essai.

24. La solution-mère est préparée, de préférence, sans l'utilisation de solvants par simple mélange ou agitation de la substance chimique d'essai dans l'eau de dilution par des moyens mécaniques (secouement ou ultrasons, par exemple). Si la substance chimique d'essai est difficile à dissoudre dans l'eau, les procédures décrites dans le document d'orientation de l'OCDE intitulé Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures (36) sont suivies. L'utilisation de solvants est à éviter mais peut, dans certains cas, s'avérer nécessaire afin d'obtenir la concentration de solution-mère souhaitée. Le document (36) donne des exemples de solvants appropriés.

25. Les conditions d'essai semi-statiques sont à éviter à moins qu'elles soient justifiées par des arguments irréfutables associés à la substance chimique d'essai (stabilité, disponibilité en quantité limitée, coût ou danger élevé, par exemple). Pour la technique semi-statique, on peut utiliser deux méthodes différentes de renouvellement du milieu. Soit on prépare de nouvelles solutions d'essai dans des récipients propres et on transfère avec précaution les œufs et les larves survivants dans les nouveaux récipients, soit on maintient les organismes d'essai dans les enceintes d'essai tout en changeant quotidiennement une partie (au moins les deux tiers) du milieu d'essai.

DÉROULEMENT DE L'ESSAI

Conditions d'exposition

Collecte des œufs et durée

26. Pour éviter les biais génétiques, les œufs sont collectés au sein de trois couples ou groupes reproducteurs minimum, mélangés et sélectionnés au hasard pour démarrer l'essai. Pour l'épinoche, une description de la procédure de fertilisation artificielle est fournie dans l'Appendice 11. L'essai démarre aussitôt que possible après que les œufs aient été fécondés, les

▼M6

embryons étant de préférence immergés dans les solutions d'essai avant que la division du blastodisque ne commence ou aussi près que possible après ce stade et pas plus de 12 h après la fécondation. L'essai continue jusqu'à ce que la différenciation sexuelle dans le groupe témoin soit achevée (60 jours après l'éclosion pour le medaka japonais, l'épinoche et le poisson-zèbre).

Charge

27. Au début de l'essai, on utilise au moins 120 œufs fécondés par concentration, répartis dans au moins quatre réplicats (la répartition par racine carrée dans le témoin est acceptée). Les œufs sont répartis au hasard (selon les tableaux statistiques de randomisation) dans les différents traitements. Il convient que le taux de charge (voir Appendice 1 pour la définition) soit suffisamment faible pour que la concentration en oxygène dissous puisse être maintenue sans aération directe à au moins 60 % de la valeur de saturation en air. Pour les essais dynamiques, il est recommandé que le taux de charge ne dépasse pas 0,5 g/l sur 24 heures et 5 g/l à un moment quelconque. Au plus tard 28 jours après la fécondation, le nombre de poissons par réplicat est redistribué de telle sorte que chaque réplicat contienne un nombre égal de poissons dans la mesure du possible. En cas de mortalité due à l'exposition, le nombre de réplicats est dûment réduit de sorte que la densité de poissons entre les niveaux de traitement soit maintenue aussi égale que possible.

Lumière et température

28. La photopériode et la température de l'eau sont adaptées à l'espèce testée (voir les conditions expérimentales dans l'Appendice 2).

Alimentation

29. La nourriture et l'alimentation sont des points critiques, et pour chaque stade de développement, il est primordial de fournir la nourriture appropriée à des intervalles de temps déterminés et dans des quantités suffisantes pour que la croissance soit normale. La nourriture est donnée *ad libitum* tout en minimisant le surplus. Pour que le taux de croissance soit suffisant, les poissons sont nourris au moins deux fois par jour (éventuellement une fois par jour le week-end), à raison d'un intervalle d'au moins trois heures entre chaque repas. La nourriture et les excréments sont retirés quand cela s'avère nécessaire afin d'éviter l'accumulation de déchets. Au fur et à mesure que l'on acquiert de l'expérience, on améliore continuellement la nourriture et les régimes alimentaires afin d'augmenter le taux de survie et d'optimiser la croissance. On s'efforce donc de faire confirmer le régime proposé par des experts reconnus. Les poissons ne sont plus être nourris durant les 24 heures qui précèdent la fin de l'essai. L'Appendice 2 donne des exemples de régimes alimentaires adaptés (voir également le document Fish Toxicity Testing Framework de l'OCDE (39).

Concentrations de la substance chimique d'essai

30. Les concentrations de la substance chimique d'essai sont espacées tel que décrit à l'Appendice 4. Au moins trois concentrations de la substance d'essai placées dans au moins quatre réplicats sont utilisées. Pour choisir la gamme des concentrations d'essai, on s'inspire de la courbe qui donne la CL_{50} en fonction de la période d'exposition dans les études de toxicité aiguë. Cinq concentrations de la substance d'essai sont recommandées s'il est prévu d'utiliser les données pour l'évaluation des risques.

31. Il n'est pas nécessaire de tester les concentrations supérieures à 10 % de la CL_{50} aiguë chez les adultes ou à 10 mg/l, quelle que soit la plus faible. Il convient que la concentration maximale représente 10 % de la CL_{50} chez les larves/juvéniles.

▼M6

Témoins

32. Un témoin contenant l'eau de dilution (≥ 4 réplicats) et, si nécessaire, un témoin contenant le solvant (≥ 4 réplicats) sont inclus dans l'essai en plus des concentrations de la substance d'essai. Seuls les solvants pour lesquels on a vérifié qu'ils n'avaient pas d'influence statistique significative sur les effets mesurés durant l'essai sont utilisés dans cet essai.

33. Si un solvant est utilisé, sa concentration finale ne dépasse pas 0,1 ml/l (36) et la concentration est identique dans toutes les enceintes d'essai, sauf le témoin avec l'eau de dilution. Néanmoins, on évitera autant que possible d'utiliser un solvant, sinon on veillera à maintenir les concentrations de solvant à un minimum.

Fréquence des dosages analytiques et des mesures

34. L'analyse chimique de la concentration de la substance chimique d'essai est effectuée avant le démarrage de l'essai afin de vérifier la conformité aux critères de validité. Tous les réplicats sont dosés séparément au début et à la fin de l'essai. Un réplicat par concentration de la substance d'essai est dosé au moins une fois par semaine au cours de l'essai, avec une rotation systématique des réplicats (1, 2, 3, 4, 1, 2 …). Si les échantillons sont stockés en vue d'un dosage ultérieur, il convient que la méthode de stockage des échantillons ait été validée en amont. Les échantillons sont filtrés (avec par exemple une dimension de pore de 0,45 μm) ou centrifugés afin de s'assurer que seule la substance chimique en solution est dosée analytiquement.

35. Au cours de l'essai, on mesurer l'oxygène dissous, le pH, la dureté totale, la conductivité, la salinité (s'il y a lieu) et la température dans toutes les enceintes d'essai. L'oxygène dissous, la salinité (s'il y a lieu) et la température sont mesurés au moins une fois par semaine; le pH, la conductivité et la dureté sont mesurés au minimum au début et à la fin de l'essai. Il est préférable de surveiller la température en continu dans au moins une enceinte.

36. Les résultats sont exprimés à partir des concentrations mesurées. Toutefois, si la concentration de la substance chimique d'essai en solution a été correctement maintenue tout au long de l'essai dans un intervalle de ± 20 % autour de la concentration nominale, les résultats peuvent être calculés à partir des valeurs nominales ou mesurées.

Observations et mesures

Stade du développement embryonnaire

37. L'exposition démarre aussitôt que possible après la fécondation et avant le début de la division du blastodisque et pas plus de 12 h après la fécondation pour garantir l'exposition dès le début du développement embryonnaire.

Éclosion et survie

38. Il faut observer et dénombrer les éclosions et les survivants au moins une fois par jour. Les embryons, larves et juvéniles morts sont enlevés dès qu'ils sont repérés, du fait qu'ils peuvent se décomposer rapidement et être mis en morceaux par les autres poissons. On fait très attention quand on retire les individus morts afin de ne pas heurter ou léser physiquement les œufs et larves proches qui sont extrêmement délicats et sensibles. Les critères indiquant la mort varient selon le stade de développement:

— pour les œufs: en particulier au début de leur cycle, diminution marquée de la transparence et/ou modification de la coloration, provoquées par la coagulation et/ou la précipitation des protéines et conduisant à un aspect blanc opaque;

▼M6

— pour les larves et les juvéniles: immobilité et/ou absence de mouvement respiratoire et/ou absence de battement du cœur et/ou coloration blanche opaque du système nerveux central et/ou absence de réaction à un stimulus mécanique.

Apparence anormale

39. On note le nombre de larves ou de poissons présentant une anomalie corporelle et on décrit l'aspect et la nature de l'anomalie. Il faut savoir que des embryons et larves anormaux surviennent de façon naturelle et que, chez le(s) témoin(s) de certaines espèces, leur proportion peut atteindre plusieurs pour cent. Les animaux anormaux ne sont retirés des récipients d'essai qu'à leur mort. Toutefois, conformément à la directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, en cas d'observation de souffrance considérable (effets très graves et mort prévisible de façon fiable), les animaux sont anesthésiés et euthanasiés selon le mode opératoire décrit au paragraphe 44 et comptabilisés en tant de décès pour l'analyse des données.

Comportement anormal

40. Des anomalies telles qu'une hyperventilation, une nage non coordonnée, une immobilité anormale et un comportement alimentaire atypique sont notées lorsqu'elles apparaissent.

Poids

41. À la fin de l'essai, tous les poissons survivants sont euthanasiés (anesthésiés si des prélèvements sanguins doivent être effectués) et pesés individuellement à sec.

Longueur

42. A la fin de l'essai, il est recommandé de mesurer la longueur de chaque individu (longueur standard).

43. Ces observations permettront de disposer pour le rapport d'essai de tout ou une partie des données suivantes:

— mortalité cumulée;

— nombre de poissons sains à la fin de l'essai;

— moment du commencement de l'éclosion et de la fin de celle-ci;

— longueur et poids des animaux survivants;

— nombre de larves déformées;

— nombre de poissons présentant un comportement anormal.

Prélèvement sur les poissons

44. Le prélèvement sur les poissons est effectué à la fin de l'essai. Les poissons échantillonnés sont euthanasiés avec, par exemple, du MS-222 (100-500 mg/l tamponnés avec 200 mg/l de $NaHCO_3$) ou du FA-100 (4-allyl-2-méthoxyphénol: eugénol), et la longueur et le poids frais à sec de chaque individu sont mesurés, ou bien les poissons sont anesthésiés si un prélèvement sanguin doit être effectué (voir paragraphe 49).

Prélèvement pour l'analyse de la VTG et la détermination du sexe via l'évaluation histologique

45. Des prélèvements sont effectués sur tous les poissons, qui sont préparés en vue de l'analyse du sexe et de la VTG. Tous les poissons font l'objet d'une analyse histologique visant à déterminer leur sexe. Pour les dosages de la

▼M6

VTG, un sous-échantillon issu d'au moins 16 poissons de chaque réplicat est accepté. L'analyse de la VTG est effectuée sur un plus grand nombre de poissons si les résultats du sous- échantillon se révèlent imprécis.

46. La procédure de prélèvement pour la détermination de la VTG et du sexe dépend de la méthode d'analyse de la VTG:

Méthode d'analyse de la VTG utilisant un homogénat tête-queue

47. Le poisson est euthanasié. La tête et la queue de chaque poisson sont séparées du reste du corps par incision au scalpel au niveau de la partie antérieure des nageoires pectorales et de la nageoire dorsale (voir Figure 1). La tête et la queue de chaque poisson forment un ensemble qui est pesé, et chaque ensemble tête-queue est numéroté puis congelé dans de l'azote liquide et stocké à une température inférieure ou égale à – 70 °C pour l'analyse de la VTG. Le reste du corps est numéroté et fixé dans une solution de fixation appropriée pour l'évaluation histologique (22). Cette méthode permet d'évaluer la VTG et l'histopathologie sur chaque individu, et une évolution éventuelle du niveau de VTG peut ainsi être corrélée au sexe phénotypique du poisson ou au sexe génétique (medaka japonais et épinoche) du poisson [pour de plus amples informations, voir le guide d'homogénéisation (Appendice 5) et le guide de quantification de la VTG (Appendice 6)].

Méthode d'analyse de la VTG utilisant un homogénat hépatique

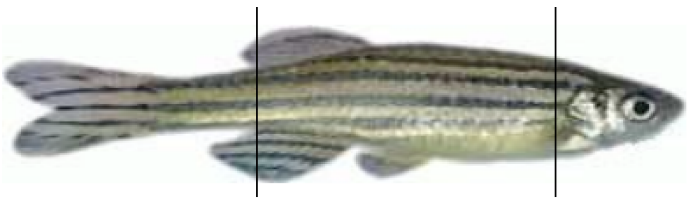
48. Le poisson est euthanasié. Le foie est extrait par dissection puis stocké à une température inférieure ou égale à – 70 °C. Les procédures recommandées pour l'excision du foie et le prétraitement figurent dans ligne directrice 229 de l'OCDE (37) ou dans le chapitre C.37 de la présente annexe (38). Les foies sont ensuite homogénéisés séparément tel que décrit dans la ligne directrice 229 de l'OCDE ou le chapitre C.37 de la présente annexe. Le surnageant collecté sert à doser la VTG par le biais d'une technique ELISA homologue [voir exemple de quantification chez le poisson-zèbre à l'Appendice 6 ou dans la ligne directrice 229 de l'OCDE (37) pour le medaka japonais]. En suivant cette démarche, il est également possible d'obtenir des données sur la VTG et l'histologie gonadique de chaque poisson.

Méthode d'analyse de la VTG utilisant le plasma sanguin

49. Les prélèvements sanguins sur les poissons anesthésiés sont effectués par ponction cardiaque, dans la veine caudale ou par sectionnement de la queue, puis centrifugés à une température de 4 °C pour la collecte du plasma. Le plasma est stocké à une température inférieure ou égale à – 70 °C jusqu'à son utilisation. Le poisson est entièrement euthanasié et fixé pour l'histologie. Les échantillons de plasma et les poissons sont numérotés séparément pour corréler les niveaux de VTG au sexe des poissons.

Figure 1

Comment couper un poisson pour le dosage de la VTG dans un homogénat tête-queue et l'évaluation histologique de la section médiane.



▼M6

Détermination du sexe génétique

50. Un prélèvement biologique pour la détermination du sexe génétique est effectué sur chaque poisson appartenant à l'une des espèces possédant les biomarqueurs adéquats. Pour le medaka japonais, la nageoire anale ou la nageoire dorsale est collectée. Le prélèvement tissulaire et la détermination du sexe par réaction en chaîne par polymérase (PCR) sont détaillés dans l'Appendice 9. De la même façon, pour l'épinoche, une description de la procédure d'échantillonnage ainsi que de la méthode PCR pour la détermination du sexe génétique est fournie dans l'Appendice 10.

Dosage de la VTG

51. Le dosage de la VTG est effectué à l'aide d'une méthode analytique quantitative validée. Il convient de disposer d'informations sur la variabilité intra-essai et inter-essais de la méthode utilisée dans un laboratoire donné. La source de variabilité inter-laboratoires et intra-laboratoire dépend (très probablement) des différents stades de développement de la population de poissons. Étant donnée la variabilité du dosage de la VTG, les CSEO basées exclusivement sur cet effet mesuré sont considérées avec une grande prudence. Différentes méthodes permettent d'évaluer la production de VTG dans les espèces de poissons prises en compte dans cet essai. La méthode ELISA (procédé immunochimique d'absorption enzymatique) constitue une méthode de dosage de la VTG à la fois relativement sensible et spécifique. Des anticorps homologues (de la VTG de la même espèce) et surtout des standards homologues sont utilisés.

Détermination du sexe

52. Selon la procédure de prélèvement de la VTG, le corps entier ou la partie centrale restante de chaque poisson est placé(e) sur une cassette de traitement pré-étiquetée et fixé(e) dans une solution de fixation appropriée pour la détermination histologique du sexe (également pour le classement par stade des gonades, optionnel). L'Appendice 7 et le document d'orientation de l'OCDE intitulé Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads (22) donnent des orientations sur la fixation et l'inclusion. À l'issue du traitement, les poissons sont placés dans un bloc de paraffine. Les individus sont placés dans ce bloc selon l'axe longitudinal. Au moins six coupes longitudinales (3-5 µm d'épaisseur) dans un plan frontal comprenant le tissu gonadal des deux gonades sont faites sur chaque individu. L'intervalle entre ces coupes est de 50 µm environ pour les mâles et de 250 µm environ pour les femelles. Toutefois, étant donné que chaque bloc contient souvent des mâles et des femelles (si plus d'un individu est inclus dans chaque bloc), l'intervalle entre les coupes effectuées dans ces blocs est de 50 µm environ jusqu'à ce que l'on obtienne au moins six coupes des gonades de chaque mâle. Par la suite, l'intervalle entre les coupes peut être augmenté jusqu'à 250 µm environ pour les femelles. Les coupes sont colorées à l'hématoxyline et à l'éosine puis examinées au microscope optique, l'observation étant axée sur le sexe (masculin, féminin, hermaphrodite ou indifférencié). L'hermaphrodisme est défini comme la présence de plus d'un ovocyte dans les testicules par lot de six coupes analysées ou de cellules spermatogéniques dans les ovaires (oui/non). L'histopathologie et le classement par stade des ovaires et des testicules sont optionnels, mais s'ils sont pratiqués, les résultats font l'objet d'une analyse statistique et d'un rapport. Il est intéressant de noter que certaines espèces de poissons ne possèdent pas, à l'état naturel, de paire de gonades entièrement développée et qu'une seule gonade peut être présente (medaka japonais et parfois poisson-zèbre, par exemple). Toutes ces observations sont consignées par écrit.

53. Chez le medaka japonais, le sexe génétique est déterminé en fonction de la présence ou de l'absence du gène qui détermine le sexe masculin chez le

▼M6

medaka, le DMY, qui est situé sur le chromosome Y. Le sexe génotypique du medaka peut être identifié par séquençage du DMY à partir de l'ADN extrait d'un morceau de nageoire anale ou de nageoire dorsale, par exemple. La présence du DMY indique qu'il s'agit d'un individu de sexe masculin (XY) quel que soit le phénotype, tandis que l'absence de DMY indique qu'il s'agit d'un individu de sexe féminin (XX) quel que soit le phénotype (23). L'Appendice 9 donne des recommandations sur la préparation des tissus et la PCR. La détermination du sexe génétique individuellement chez chaque épinoche est également déterminée par analyse PCR, comme décrit dans l'Appendice 10.

54. La présence d'hermaphrodites (consulter la définition dans l'Appendice 1) est notée.

Caractères sexuels secondaires

55. Les caractères sexuels secondaires sont contrôlés par le système endocrinien chez des espèces telles que le medaka japonais; les observations relatives aux caractéristiques physiques des poissons sont donc notées si possible à la fin de l'exposition. Chez le medaka japonais, la formation de tubercules papillaires sur la partie postérieure de la nageoire anale des femelles est sensible aux androgènes. Le chapitre C.37 de la présente annexe (38) fournit des photos pertinentes des caractères sexuels secondaires de mâles et de femelles androgénisées.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

56. Il importe d'utiliser l'analyse statistique la plus valide pour déterminer l'effet mesuré. Le réplicat est l'unité expérimentale, mais la variabilité entre les réplicats est prise en compte lors de l'analyse statistique. Le diagramme de décision de l'Appendice 8 aide à choisir l'analyse statistique la plus adéquate en fonction des caractéristiques des résultats de l'essai. Le niveau de signification statistique est de 0,05 pour tous les effets mesurés pris en compte.

Proportions de sexe et de sexe génétique

57. Les proportions de sexe sont analysées pour évaluer l'effet significatif (DSEO/CMEO) de l'exposition via le test de Jonckheere-Terpstra (test des tendances) si la relation dose-réponse est monotone. Si la relation est non monotone, des comparaisons par paires sont effectuées: on utilisera le test de Dunnett si l'on peut obtenir la normalité et une variance homogène. On utilisera le test de Tamhane-Dunnett en cas de variance hétérogène. Sinon, on appliquera fidèlement le test de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni-Holm. Un diagramme de décision statistique des proportions de sexe figure à l'Appendice 8. Les proportions de sexe sont présentées sous forme de tableaux reprenant les proportions de concentration ± l'écart-type de mâles, de femelles, d'hermaphrodites et d'individus indifférenciés. Il convient de souligner la signification statistique. Des exemples sont présentés dans le rapport de validation de la phase 2 de l'essai de développement sexuel des poissons (42). Le sexe génétique est noté sous forme de pourcentage de changement de sexe phénotypique chez les mâles, les femelles, les hermaphrodites et les individus indifférenciés.

Concentrations de VTG

58. Les concentrations de VTG sont analysées pour évaluer l'effet significatif (DSEO/CMEO) de l'exposition. Le test de Dunnett est préférable au test t avec correction de Bonferroni. Si l'on applique une correction de Bonferroni, la correction de Bonferroni-Holm est préférable. Il convient d'accepter une transformation logarithmique de la VTG pour atteindre la normalité et une variance homogène. Ensuite, si la relation dose-réponse est cohérente avec la monotonie, le test de Jonckheere-Terpstra est préférable à n'importe lequel des tests précités. Si l'on utilise le test t, ou le test de Dunnett, il n'est pas nécessaire d'utiliser l'ANOVA, qui utilise le mécanisme du test de Fisher, pour poursuivre. On pourra se reporter au diagramme de décision de l'Appendice 8 pour de plus amples informations. Les proportions de sexe sont

▼M6

présentées sous forme de tableaux reprenant les concentrations moyennes ± l'écart-type de mâles, de femelles, d'hermaphrodites et d'individus indifférenciés séparément. Il convient de souligner la signification statistique des femelles phénotypiques et des mâles phénotypiques. Des exemples sont présentés dans le rapport de validation de la phase 2 de l'essai de développement sexuel des poissons (42).

Concentrations réelles de la substance chimique d'essai

59. Les concentrations réelles de la substance chimique d'essai dans les enceintes sont analysées selon les fréquences décrites au paragraphe 34. Les résultats sont notés dans des tableaux sous forme de concentration moyenne ± l'écart-type sur la base des réplicats ainsi que de la concentration, l'accent étant mis sur les informations sur le nombre d'échantillons et sur les valeurs de concentration aberrantes par rapport à la concentration moyenne des traitements ± 20 %. Des exemples figurent dans le rapport de validation de la phase 2 de l'essai de développement sexuel des poissons (42).

Interprétation des résultats

60. Les résultats sont interprétés avec prudence lorsque les concentrations de la substance chimique d'essai mesurées en solutions d'essai atteignent des niveaux proches de la limite de détection de la méthode d'analyse.

Rapport

61. Le rapport de l'essai comprend les informations suivantes:

Substance chimique d'essai

— propriétés physico-chimiques pertinentes; données relatives à l'identification chimique, dont la pureté et la méthode analytique de dosage de la substance chimique d'essai.

Conditions d'essai:

— mode opératoire utilisé (dynamique ou semi-statique); conception de l'essai comprenant les concentrations de la substance d'essai, la méthode de préparation des solutions-mères (dans une annexe), la fréquence de renouvellement (le solvant et sa concentration sont indiqués si ledit solvant est utilisé);

— concentrations nominales de la substance d'essai, valeurs moyennes mesurées, déviations standard de ces moyennes dans les enceintes d'essai et méthode ayant permis de les obtenir (la méthode analytique utilisée est présentée dans une annexe). Données disponibles devant démontrer que les dosages correspondent aux concentrations de la substance chimique d'essai en solution vraie;

— qualité de l'eau dans les enceintes d'essai: pH, dureté, température et concentration d'oxygène dissous.

— Informations détaillées sur l'alimentation (par exemple type d'aliments, provenance, quantité donnée et fréquence) et analyse des contaminants pertinents (PCB, HAP et pesticides organochlorés, par exemple).

Résultats

— données disponibles démontrant que les témoins ont rempli les critères de validité: les données sur le taux d'éclosion sont présentées sous forme de tableaux indiquant le pourcentage par réplicat et par concentration. Les résultats aberrants par rapport aux critères de validité (dans les témoins) sont soulignés. La survie est présentée sous forme de pourcentage par réplicat et par concentration. Les résultats aberrants par rapport aux critères de validité (dans les témoins) sont soulignés.

— Indication claire des résultats obtenus par rapport aux différents effets observés: survie des embryons et réussite de l'éclosion; anomalies externes; longueur et poids; dosages de la VTG (ng/g d'homogénat, ng/ml de plasma ou ng/mg de foie); données sur l'histologie gonadique,

▼**M6**

le ratio mâles/femelles et le sexe génétique; fréquence des réactions inhabituelles des poissons et des effets visibles produits par la substance chimique d'essai.

62. Les résultats sont présentés sous forme de valeurs moyennes ± l'écart-type ou l'erreur-type. Les résultats statistiques sont notés au minimum sous forme de DSEO et de CMEO et d'intervalles de confiance. Le diagramme de décision (Appendice 8) est suivi.

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (1992), *Poisson, Essai de Toxicité aux Premiers Stades de la Vie*, Ligne directrice n° 210 pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.

(2) Jobling,S., D.Sheahan, J.A.Osborne, P.Matthiessen, and J.P.Sumpter, 1996, «Inhibition of testicular growth in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals», Environmental Toxicology and Chemistry 15, pp. 194-202.

(3) Sumpter,J.P. and S.Jobling, 1995, «Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment», Environmental Health Perspectives 103, pp. 173-178.

(4) Tyler,C.R., R.van Aerle, T.H.Hutchinson, S.Maddix, and H.Trip (1999), «An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin», Environmental Toxicology and Chemistry 18, pp. 337-347.

(5) Holbech,H., L.Andersen, G.I.Petersen, B.Korsgaard, K.L.Pedersen, and P.Bjerregaard (2001a), «Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio)», Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 130, pp. 119-131.

(6) Andersen,L., P.Bjerregaard, and B.Korsgaard (2003), «Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters», Fish Physiology and Biochemistry 28, pp. 319-321.

(7) Orn,S., H.Holbech, T.H.Madsen, L.Norrgren, and G.I.Petersen (2003), «Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (Danio rerio) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone», Aquatic Toxicology 65, pp. 397-411.

(8) Panter,G.H., T.H.Hutchinson, R.Lange, C.M.Lye, J.P.Sumpter, M.Zerulla, and C.R.Tyler (2002), «Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances», Environmental Toxicology and Chemistry 21, pp. 319-326.

(9) Sun,L.W., J.M.Zha, P.A.Spear, and Z.J.Wang (2007), «Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (Oryzias latipes) eggs, larvae and breeding adults», Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, pp. 533-541.

(10) Parks,L.G., A.O.Cheek, N.D.Denslow, S.A.Heppell, J.A.McLachlan, G.A.LeBlanc, and C.V.Sullivan (1999), «Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds», Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 123, pp. 113-125.

(11) Brion,F., B.M.Nilsen, J.K.Eidem, A.Goksoyr, and J.M.Porcher (2002), «Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio)», Environmental Toxicology and Chemistry 21, pp. 1699-1708.

(12) Nishi,K., M.Chikae, Y.Hatano, H.Mizukami, M.Yamashita, R.Sakakibara, and E.Tamiya (2002), «Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (Oryzias latipes) vitellogenin», Comparative Biochemistry and Physiology C- Toxicology & Pharmacology 132, pp. 161-169.

(13) Hahlbeck,E., I.Katsiadaki, I.Mayer, M.Adolfsson-Erici, J.James, and B.E.Bengtsson (2004), «The juvenile three-spined stickleback (Gasterosteus

▼M6

aculeatus L.) as a model organism for endocrine disruption — II — kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction», Aquatic Toxicology 70, pp. 311-326.

(14) Tatarazako,N., M.Koshio, H.Hori, M.Morita, and T.Iguchi (2004), «Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka», Journal of Health Science 50, pp. 301-308.

(15) Eidem,J.K., H.Kleivdal, K.Kroll, N.Denslow, R.van Aerle, C.Tyler, G.Panter, T.Hutchinson, and A.Goksoyr (2006), «Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin. Aquatic Toxicology», 78, pp. 202-206.

(16) Jensen,K.M. and G.T.Ankley (2006), «Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (Pimephales promelas)», Ecotoxicology and Environmental Safety 64, pp. -105.

(17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A.,Örn, S, Norrgren, L., and Bjerregaard, P (2001b), «Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)», Nordic Council of Ministers, TemaNord 2001:597, pp. 48-51.

(18) Nilsen,B.M., K.Berg, J.K.Eidem, S.I.Kristiansen, F.Brion, J.M.Porcher, and A.Goksoyr (2004), «Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening», Analytical and Bioanalytical Chemistry 378, pp. 621-633.

(19) Orn,S., S.Yamani, and L.Norrgren (2006), «Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha- ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone», Archives of Environmental Contamination and Toxicology 51, pp. 237-243.

(20) Scholz,S. and N.Kluver (2009), «Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish», Sexual Development 3, pp. 136-151.

(21) Fenske,M., G.Maack, C.Schafers, and H.Segner (2005), «An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, Danio rerio», Environmental Toxicology and Chemistry 24, pp. 1088-1098.

(22) OCDE (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Série sur les essais et l'évaluation N° 123, ENV/JM/M0N0(2010)14, OCDE, Paris.

(23) Kobayashi,T., M.Matsuda, H.Kajiura-Kobayashi, A.Suzuki, N.Saito, M.Nakamoto, N.Shibata, and Y.Nagahama (2004), «Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, Oryzias latipes», Developmental Dynamics 231, pp. 518-526.

(24) Shinomiya,A., H.Otake, K.Togashi, S.Hamaguchi, and M.Sakaizumi (2004), «Field survey of sex- reversals in the medaka, Oryzias latipes: genotypic sexing of wild populations», Zoological Science 21, pp. 613-619.

(25) Kidd,K.A., P.J.Blanchfield, K.H.Mills, V.P.Palace, R.E.Evans, J.M.Lazorchak, and R.W.Flick (2007), «Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen», Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, pp. 8897-8901.

(26) Palace,V.P., R.E.Evans, K.G.Wautier, K.H.Mills, P.J.Blanchfield, B.J.Park, C.L.Baron, and K.A.Kidd (2009), «Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake», Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 66, pp. 1920-1935.

(27) Panter,G.H., T.H.Hutchinson, K.S.Hurd, J.Bamforth, R.D.Stanley, S.Duffell, A.Hargreaves, S.Gimeno, and C.R.Tyler (2006), «Development of chronic tests for endocrine active chemicals — Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (Pimephales promelas)», Aquatic Toxicology 77, pp. 279-290.

▼**M6**

(28) Holbech,H., K.Kinnberg, G.I.Petersen, P.Jackson, K.Hylland, L.Norrgren, and P.Bjerregaard (2006), «Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (EDSP)», Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 144, pp. 57-66.

(29) Andersen,L., K.Kinnberg, H.Holbech, B.Korsgaard, and P.Bjerregaard (2004), «Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (Danio rerio)», Fish Physiology and Biochemistry 30, pp. 257-266.

(30) Morthorst,J.E., H.Holbech, and P.Bjerregaard (2010), «Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations», Aquatic Toxicology 98, pp. 336-343.

(31) Kiparissis,Y., T.L.Metcalfe, G.C.Balch, and C.D.Metcalf (2003), «Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (Oryzias latipes)», Aquatic Toxicology 63, pp. 391-403.

(32) Panter,G.H., T.H.Hutchinson, K.S.Hurd, A.Sherren, R.D.Stanley, and C.R.Tyler (2004), «Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development», Aquatic Toxicology 70, pp. 11-21.

(33) Kinnberg,K., H.Holbech, G.I.Petersen, and P.Bjerregaard (2007), «Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (Danio rerio)», Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, pp. 165-170.

(34) Chapitre C.14 de la présente annexe: Poisson, essai sur la croissance des juvéniles.

(35) Chapitre C.4 de la présente annexe: Détermination de la biodégradabilité «facile».

(36) OCDE (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Série sur les essais et l'évaluation N° 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OCDE, Paris.

(37) OCDE (2009), *Essai à court terme de reproduction des poissons*, Ligne directrice N° 229 pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.

(38) Chapitre C.37 de la présente annexe: Essai de 21 jours sur les poissons: essai de dépistage à court terme de l'activité oestrogénique et androgénique, et de l'inhibition de l'aromatase.

(39) OCDE (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Série sur les essais et l'évaluation N° 171, OCDE, Paris.

(40) Schäfers, C., Teigeler,M., Wenzel,A., Maack,G., Fenske,M., Segner,H (2007), «Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, Danio rerio» Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A, 70, 9-10 pp 768-779.

(41) OCDE (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Série sur les essais et l'évaluation N° 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OCDE, Paris.

(42) OCDE (2011), V*alidation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Série sur les essais et l'évaluation N° 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OCDE, Paris.

(43) OCDE (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Série sur les essais et l'évaluation N° 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OCDE, Paris.

(44) Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. JO L 276 du 20.10.2010, p. 33.

▼**M6**

Appendice 1

Abréviations et définitions

Effet apical: ayant des effets au niveau de la population

VSA: valeur de la saturation en air

Biomarqueur: ayant des effets au niveau individuel

Substance chimique: une substance ou un mélange

DMY: gène lié à Y du domaine DM indispensable au développement des caractères masculins chez le medaka japonais

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay): essai d'immuno-absorption enzymatique

Poids de poissons: poids frais de poissons (à sec)

EDSP: eessai de développement sexuel des poissons

Axe HHG: axe hypothalamo-hypophyso-gonadique

Hermaphrodite: poisson ayant plus d'un ovocyte dans les testicules par lot de six coupes analysées ou des cellules spermatogéniques dans les ovaires (oui/non)

Taux de charge: poids frais de poissons par unité de volume d'eau

RT-PCR: transcription inverse suivie d'une réaction en chaîne par polymérase

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Poisson indifférencié: poisson dont les gonades sont dénuées de cellules germinales visibles

VTG: vitellogénine

▼**M6**

Appendice 2

Conditions expérimentales de l'EDSP (espèces d'eau douce)

1. Espèces recommandées	Medaka japonais (*Oryzias latipes*)	Poisson-zèbre(*Danio rerio*)	Épinoche à trois épines (*Gasterostreus aculeatus*)
2. Type d'essai	dynamique ou semi-statique	dynamique ou semi-statique	dynamique ou semi-statique
3. Température de l'eau	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Qualité de l'éclairage	Ampoules fluorescentes (à large spectre)	Ampoules fluorescentes (à large spectre)	Ampoules fluorescentes (à large spectre)
5. Intensité de l'éclairage	10-20 µE/m^2/s, 540-1 080 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire)	10-20 µE/m^2/s, 540-1 080 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire)	10-20 µE/m^2/s, 540-1 080 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire)
6. Photopériode	12-16 h de lumière, 8-12 h d'obscurité	12-16 h de lumière, 8-12 h d'obscurité	16 h de lumière, 8 d'obscurité
7. Volume minimum des enceintes	Chaque enceinte peut contenir au moins 7 l d'eau	Chaque enceinte peut contenir au moins 7 l d'eau	Chaque enceinte peut contenir au moins 7 l d'eau
8. Remplacement volumique des solutions d'essai	Minimum 5 fois/jour	Minimum 5 fois/jour	Minimum 5 fois/jour
9. Âge des organismes d'essai au début de l'exposition	Œufs nouvellement fécondés (au stade du blastodisque)	Œufs nouvellement fécondés (au stade du blastodisque)	Œufs nouvellement fécondés
10. Nombre d'œufs par traitement	Minimum 120	Minimum 120	Minimum 120
11. Nombre de traitements	Minimum 3 (plus témoins appropriés)	Minimum 3 (plus témoins appropriés)	Minimum 3 (plus témoins appropriés)
12. Nombre de réplicats par traitement	Minimum 4 (sauf répartition par racine carrée dans les témoins)	Minimum 4 (sauf répartition par racine carrée dans les témoins)	Minimum 4 (sauf répartition par racine carrée dans les témoins)
13. Régime alimentaire	Artémies vivantes, nauplies d'artémies adultes congelées, flocons, etc. Il est recommandé de nourrir les poissons deux fois par jour.	Friture spéciale, artémies vivantes, nauplies d'artémies adultes congelées, flocons, etc. Il est recommandé de nourrir les poissons deux fois par jour.	Artémies vivantes, nauplies d'artémies adultes congelées, flocons, etc. Il est recommandé de nourrir les poissons deux fois par jour.
14. Aération	Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 60 % de la valeur de la saturation en air	Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 60 % de la valeur de la saturation en air	Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 70 % de la valeur de la saturation en air

▼**M6**

15. Eau de dilution	Eau de surface, de puits ou reconstituée	Eau de surface, de puits ou reconstituée	Eau de surface, de puits ou reconstituée
16. Durée de l'exposition à la substance chimique d'essai	60 jours après l'éclosion	60 jours après l'éclosion	60 jours après l'éclosion
17. Effets biologiques mesurés	Éclosion réussie, survie, morphologie brute, VTG, histologie gonadique, sexe génétique, ratio mâles/femelles	Éclosion réussie, survie, morphologie brute, VTG, histologie gonadique, ratio mâles/femelles	Éclosion réussie, survie, morphologie brute, VTG, histologie gonadique, ratio mâles/femelles
18. Critères de validité de l'essai pour les lots de réplicats des témoins	Éclosion réussie > 80	Éclosion réussie > 80	Éclosion réussie > 80
	Survie après éclosion ≥ 70 %	Survie après éclosion ≥ 70 %	Survie après éclosion ≥ 70 %
	Croissance (poids frais de poissons à sec) >150 mg	Croissance (poids frais de poissons à sec) > 75 mg	Croissance (poids frais de poissons à sec) > 120 mg
	Longueur (longueur standard) > 20 mm	Longueur (longueur standard) > 14 mm	Longueur (longueur standard) > 20 mm
	Ratio mâles/femelles 30 %-70 %	Ratio mâles/femelles 30 %-70 %	Ratio mâles/femelles 30 %-70 %

▼**M6**

Appendice 3

Caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable

CONSTITUANT	CONCENTRATIONS
Particules	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	< 50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

▼**M6**

Appendice 4

Extrait de la méthode d'essai C.14/orientations sur les concentrations de substance d'essai

Colonne (Nombre de concentrations entre 100 et 10 ou entre 10 et 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Une série de trois concentrations successives (ou plus) peut être choisie dans une colonne. Les points intermédiaires entre les concentrations d'une colonne (x) se trouvent dans la colonne (2x + 1). Les valeurs énumérées peuvent représenter des concentrations exprimées sous forme de pourcentage en volume ou en poids (mg/l ou µg/l). Les valeurs peuvent être multipliées ou divisées par la puissance de 10 adéquate. On pourra utiliser la première colonne si le degré de toxicité est très incertain.

▼M6

Appendice 5

Guide d'homogénéisation de la tête et de la queue des juvéniles des espèces poisson- zèbre, tête-de-boule, épinoche à trois épines et medaka japonais

Cette partie a pour objet de décrire les procédures qui précèdent la quantification de la concentration de VTG. D'autres procédures permettant un dosage similaire de la VTG peuvent être utilisées. La concentration de VTG peut, de manière optionnelle, être déterminée dans le plasma sanguin ou le foie au lieu d'un homogénat tête-queue.

Procédure

1. Les poissons sont anesthésiés puis euthanasiés conformément à la description de l'essai.

2. La tête et la queue des poissons sont coupées conformément à la description de l'essai. **Note importante**: tous les instruments de dissection ainsi que la planche à découper sont rincés et lavés correctement (avec de l'éthanol à 96 %, par exemple) entre chaque manipulation de poisson pour éviter que la vitellogénine des femelles ou des mâles induits ne «pollue» les mâles non-induits.

3. L'ensemble tête-queue de chaque poisson est pesé au mg prêt.

4. Après avoir été pesés, les morceaux sont placés dans des tubes appropriés (Eppendorf de 1,5 ml, par exemple) et stockés à une température de – 80 °C jusqu'à leur homogénéisation ou bien directement homogénéisés sur de la glace avec deux pilons en plastique (d'autres méthodes peuvent être utilisées si elles impliquent de la glace et permettent d'obtenir une masse homogène). **Note importante**: *les tubes sont numérotés correctement de façon que la tête et la queue du poisson puissent être reliées à la partie du corps correspondante utilisée pour l'histologie gonadique.*

5. Après obtention d'une masse homogène, on ajoute un **tampon d'homogénéisation** (*) glacé représentant 4-10 x la masse pondérale tissulaire (noter la dilution). Continuer à pilonner jusqu'à ce que le mélange soit homogène. **Note importante**: *de nouveaux pilons sont utilisés pour chaque poisson*.

6. Les échantillons sont posés sur de la glace jusqu'à centrifugation à 50 000 g pendant 30 min. et à une température de **4 °C**.

7. Utiliser une pipette pour répartir des portions de 20 à 50 µl (noter la quantité) de surnageant dans **au moins deux** tubes en plongeant l'embout de la pipette sous la couche lipidique située à la surface et en aspirant doucement le surnageant sans fraction lipidique ni culot.

8. Les tubes sont stockés à une température de – 80 °C jusqu'à leur utilisation.

(*) *Tampon d'homogénéisation:*

50 mM de Tris-HCl de pH 7,4; 1 % de cocktail d'inhibiteurs de protéase (Sigma): 12 ml de Tris-HCl de pH 7,4 + 120 µl de cocktail d'inhibiteurs de protéase (ou de cocktails d'inhibiteurs de protéase équivalents).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Cocktail d'inhibiteurs de protéase: de chez Sigma (pour les tissus mammaliens). Numéro de produit **P 8340**.

Note: Le tampon d'homogénéisation est utilisé le jour de sa fabrication. Placer sur de la glace pendant son utilisation

▼M6

Appendice 6

Guide de quantification de la vitellogénine dans des homogénats tête-queue de poisson-zèbre (Danio Rerio) (modifié à partir de Holbech et al., 2001). d'autres procédures utilisant des anticorps et des standards homlogues peuvent être utilisées.

1. Décongeler les plaques de microtitration (certifiées Maxisorp F96, Nunc, Roskilde, Danemark) recouvertes au préalable de 5 mg/ml d'anti-IgG de lipovitelline de poisson-zèbre puis les laver 3 fois avec un tampon de lavage (*).

2. Diluer en série le standard de vitellogénine de poisson-zèbre ([1]) purifié à raison de 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10 et 20 ng/ml dans un tampon de dilution (**) et diluer les échantillons au moins 200 fois (pour éviter l'effet de matrice) dans le tampon de dilution puis les poser sur les plaques. Dupliquer un contrôle d'essai. Verser 150 µl dans chaque puits. Dupliquer les standards et tripliquer les échantillons. Faire incuber pendant une nuit à 4 °C sur un agitateur.

3. Laver 5 fois les plaques avec le tampon de lavage (*).

4. Diluer HPR associé à une chaîne de dextrane (AMDEX A/S, Danemark, par exemple) et les anticorps conjugués dans le tampon de lavage; la dilution réelle diffère selon le lot et l'âge. Verser 150 µl dans chaque puits et mettre les plaques en incubation pendant 1 heure à température ambiante sur un shaker.

5. Laver 5 fois les plaques avec le tampon de lavage (*), et nettoyer soigneusement le fond des plaques avec de l'éthanol.

6. Verser 150 µl de TMB plus (***) dans chaque puits. Protéger les plaques de la lumière avec du papier aluminium puis observer le changement de couleur sur un shaker.

7. Une fois la courbe d'étalonnage obtenue, stopper l'activité enzymatique en versant 150 µl 0,2 M de H_2SO_4 dans chaque puits.

8. Mesurer l'absorbance à hauteur de 450 nm (sur un lecteur de plaque de dispositifs moléculaires Thermomax). Analyser les données sur le logiciel associé (Softmax, par exemple).

(*) Tampon de lavage:

Stock de PBS (****)	500,0	ml
Sérum d'albumine bovine	5,0	g
Tween 20	5,0	ml

Rééquilibrer le pH à 7,3 et verser dans 5 l d'eau filtrée sur membrane millipore. Stocker à 4 °C.

(**) Tampon de dilution:

Stock de PBS (****)	100,0	ml
Sérum d'albumine bovine	3,0	g
Tween 20	1,0	ml

Rééquilibrer le pH à 7,3 et verser dans 1 l d'eau filtrée sur membrane millipore. Stocker à 4 °C.

(***) Le TMB plus est un substrat «prêt à l'emploi» produit par KemEnTec (Danemark). Il est photosensible. Stocker à 4 °C.

([1]) Battelle AP4.6.04 [1,18 mg/ml (AAA)], purifié conformément à: Denslow, N.D., Chow, M.C., Kroll, K.J., Green, L. (1999). Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. Ecotoxicology 8: 385-398.

▼**M6**

(****) Stock de PBS

NaCl	160,0	g
KH_2PO_4	4,0	g
Na_2HPO_4 $2H_2O$	26,6	g
KCl	4,0	g

Rééquilibrer le pH à 6,8 et verser dans 2 l d'eau filtrée sur membrane millipore. Stocker à température ambiante

▼M6

Appendice 7

Guide de préparation des coupes tissulaires pour la détermination du sexe et le classement par stade des gonades

Cette partie a pour objet de décrire les procédures qui précèdent l'évaluation des coupes histologiques. D'autres procédures similaires de détermination du sexe et de classement par stade des gonades peuvent être utilisées.

À quelques exceptions près, ces procédures sont similaires pour le medaka japonais et le poisson-zèbre.

Euthanasie, autopsie et fixation des tissus

Objectifs:

1. Euthanasier les poissons sans les faire souffrir.

2. Obtenir les poids corporels et les mesures nécessaires.

3. Évaluer les caractères sexuels secondaires.

4. Disséquer les tissus pour l'analyse de la VTG.

5. Fixer les gonades.

Procédures:

1. Les poissons sont euthanasiés immédiatement avant l'autopsie. Par conséquent, à moins que les prosecteurs soient nombreux, les poissons ne sont pas sacrifiés en nombre simultanément.

2. Transférer un poisson de l'enceinte d'essai vers la zone d'autopsie du conteneur de transport avec l'épuisette.

3. Placer le poisson dans la solution euthanasique. Retirer le poisson de la solution lorsqu'il ne respire plus et qu'il ne répond plus aux stimuli extérieurs.

4. Mesurer le poids frais du poisson.

5. Pour la préparation des tissus à l'analyse de la VTG, le poisson peut être placé sur un carreau de liège sur la plate-forme élevée d'un microscope à dissection.

   a. Chez le poisson-zèbre, couper la tête juste derrière la nageoire pectorale et la queue juste derrière la nageoire dorsale.

   b. Chez le medaka japonais, ouvrir l'abdomen en pratiquant soigneusement une incision le long de la ligne médiane allant de l'attache pectorale à un point situé juste au-dessus de l'anus. Exciser délicatement le foie à l'aide de pincettes et de ciseaux.

6. Placer les spécimens pour l'analyse de la VTG dans des tubes Eppendorf et les congeler immédiatement dans de l'azote liquide.

7. Placer la carcasse avec les gonades dans une cassette à tissus en plastique préétiquetée qui sera transférée dans un liquide fixateur de Davidson ou de Bouin. Le volume de fixateur est supérieur ou égal à 10 fois le volume approximatif des tissus. Agiter doucement le conteneur avec le fixateur pendant cinq secondes pour évacuer les bulles d'air de la cassette.

8. a. Laisser les tissus dans le fixateur de Davidson pendant une nuit puis les transférer dans des conteneurs individuels de formol tamponné à 10 % le lendemain. Agiter doucement les conteneurs avec les cassettes pendant 5 secondes pour que le formol pénètre bien dans les cassettes.

▼M6

b. Laisser les tissus dans le fixateur de Bouin pendant 24 h puis les transférer dans de l'éthanol à 70 %.

Traitement des tissus

Objectifs:

1. Déshydrater les tissus pour une bonne pénétration de la paraffine.

2. Imprégner les tissus de paraffine pour maintenir l'intégrité des tissus et créer une surface ferme pour la microtomie.

Procédures:

3. Retirer les cassettes étiquetées contenant les tissus du formol/de l'éthanol puis placer les cassettes dans le(s) panier(s) de traitement. Charger le panier dans l'appareil de traitement.

4. Sélectionner le programme de traitement.

5. À la fin du cycle de traitement, le(s) panier(s) peut/peuvent être transféré(s) vers la station d'inclusion.

Inclusion

Objectif:

Placer correctement le spécimen dans la paraffine solidifiée pour la microtomie.

Procédures:

1. Retirer le(s) panier(s) des cassettes de l'appareil puis immerger le(s) panier(s) dans l'enceinte- avant, remplie de paraffine, de la console thermique de la station d'inclusion, ou déplacer les cassettes vers un réchauffeur de paraffine séparé.

2. Retirer la première cassette à inclure de l'enceinte-avant de la console thermique ou du réchauffeur de paraffine. Retirer et mettre au rebut le couvercle de la cassette puis vérifier l'étiquette de la cassette par rapport aux données enregistrées sur les animaux afin de corriger les écarts éventuels avant inclusion.

3. Sélectionner un moule d'inclusion aux dimensions adéquates.

4. Placer le moule sous le bec verseur de la console de distribution et le remplir de paraffine fondue.

5. Retirer le spécimen de la cassette et le placer dans le moule rempli de paraffine fondue. Répéter cette opération avec 4-8 spécimens pour chaque moule de paraffine. Marquer la position de chaque poisson en plaçant le poisson n^{o} 1 à 180 degrés des poissons 2-4/8.

6. Recouvrir le spécimen d'une couche de paraffine supplémentaire.

7. Placer le moule et le fond de la cassette sur la plaque froide de la console cryogénique.

8. Une fois la paraffine solidifiée, démouler le bloc (à savoir la paraffine durcie contenant les tissus et le fond de la cassette).

Microtomie

Objectif:

Réalisation et montage de coupes histologiques en vue de leur coloration.

Procédures:

1. La première phase de la microtomie, appelée «facing» se déroule ainsi:

   a. Placer le bloc de paraffine dans le porte-bloc du microtome.

   b. Avancer le porte-bloc en faisant tourner la roue du microtome et effectuer des coupes épaisses à la surface du bloc de paraffine jusqu'à ce que la lame atteigne les tissus inclus.

▼M6

c. Régler l'épaisseur de coupe du microtome sur 3-5 microns. Avancer le porte- bloc et réaliser de nombreuses coupes dans le bloc pour supprimer les éventuels phénomènes parasites provoqués à la surface de coupe du tissu lors de la préparation.

d. Retirer le bloc du porte-bloc et le placer à l'envers sur de la glace pour détremper le tissu.

2. La phase suivante de la microtomie correspond à la réalisation des coupes finales et à la confection des lames. La procédure est la suivante:

a. Si le bloc a été placé sur de la glace, retirer le bloc de la glace puis le replacer dans le porte-bloc du microtome.

b. L'épaisseur de coupe étant réglée sur 3-5 microns, avancer le porte-bloc en faisant tourner la roue du microtome. Confectionner un «ruban» de coupes comptant au moins une coupe acceptable comprenant les gonades. (Si nécessaire, pendant la réalisation des coupes, retirer le bloc du porte-bloc, le placer sur de la glace pour détremper le tissu puis le replacer dans le porte- bloc).

c. Déplisser les coupes par flottaison à la surface du bain-marie. Essayer d'obtenir au moins une coupe sans plis et sans bulles d'air emprisonnées en dessous.

d. Immerger une lame sous la meilleure coupe puis sortir celle-ci de l'eau à l'aide de la lame. Ce procédé est appelé «montage» de la coupe sur la lame ou «confection des lames».

e. Préparer trois coupes pour un ensemble de poissons. Effectuer la deuxième et la troisième coupe à 50 microns d'intervalle de la première. Si les poissons ne sont pas inclus avec leurs gonades dans le même niveau de coupe, effectuer plus de coupes pour s'assurer qu'au moins six coupes comprenant les gonades sont obtenues de chaque poisson.

f. Noter sur la lame, à l'aide d'un marqueur spécial, le numéro du bloc à partir duquel la lame a été confectionnée.

g. Placer la lame sur un support pour coloration de lames.

h. Retirer le bloc du porte-bloc puis le placer à l'envers pour stockage.

Coloration, application des lamelles et étiquetage des lames

Objectifs:

— Coloration des coupes en vue de l'analyse histopathologique

— Coloration et montage étanche permanents des tissus

— Identification permanente des coupes colorées de manière à assurer une traçabilité parfaite.

Procédures:

1. Coloration

a. Laisser sécher les lames à l'air libre toute une nuit avant leur coloration.

b. Colorer les coupes à l'hématoxyline-éosine.

2. Application des lamelles

a. Les lamelles peuvent être appliquées manuellement ou automatiquement.

b. Tremper une lame dans du xylène ou du TissueClear®, puis retirer délicatement l'excès de xylène/TissueClear® de la lame.

▼**M6**

c. Appliquer 0,1 ml environ de medium de montage près du bord de la lame à l'opposé du bord dépoli ou sur la lamelle.

d. Appliquer la lamelle sur la lame en l'inclinant légèrement.

3. Étiquetage des lames

e. Chaque étiquette contient les informations suivantes:

i. Nom du laboratoire

ii. Espèce

iii. Spécimen n^{o}/lame n^{o}

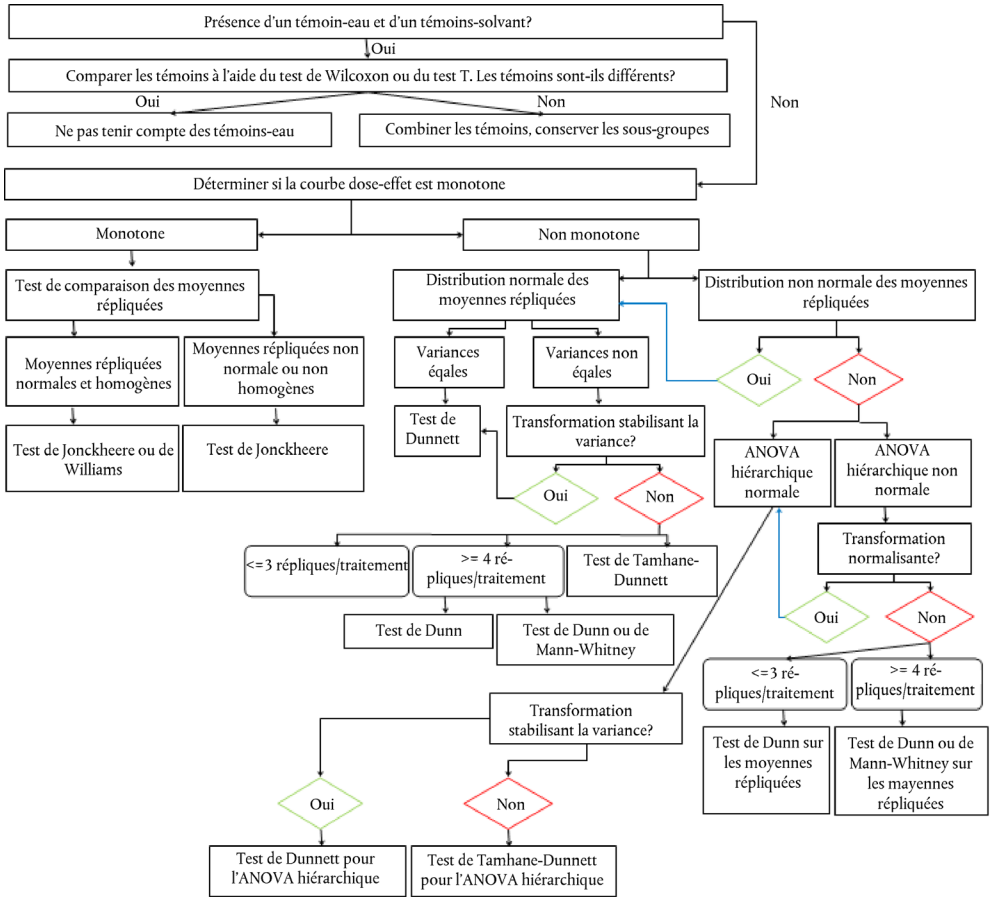
iv. Groupe de traitement chimique

v. Date

▼M6

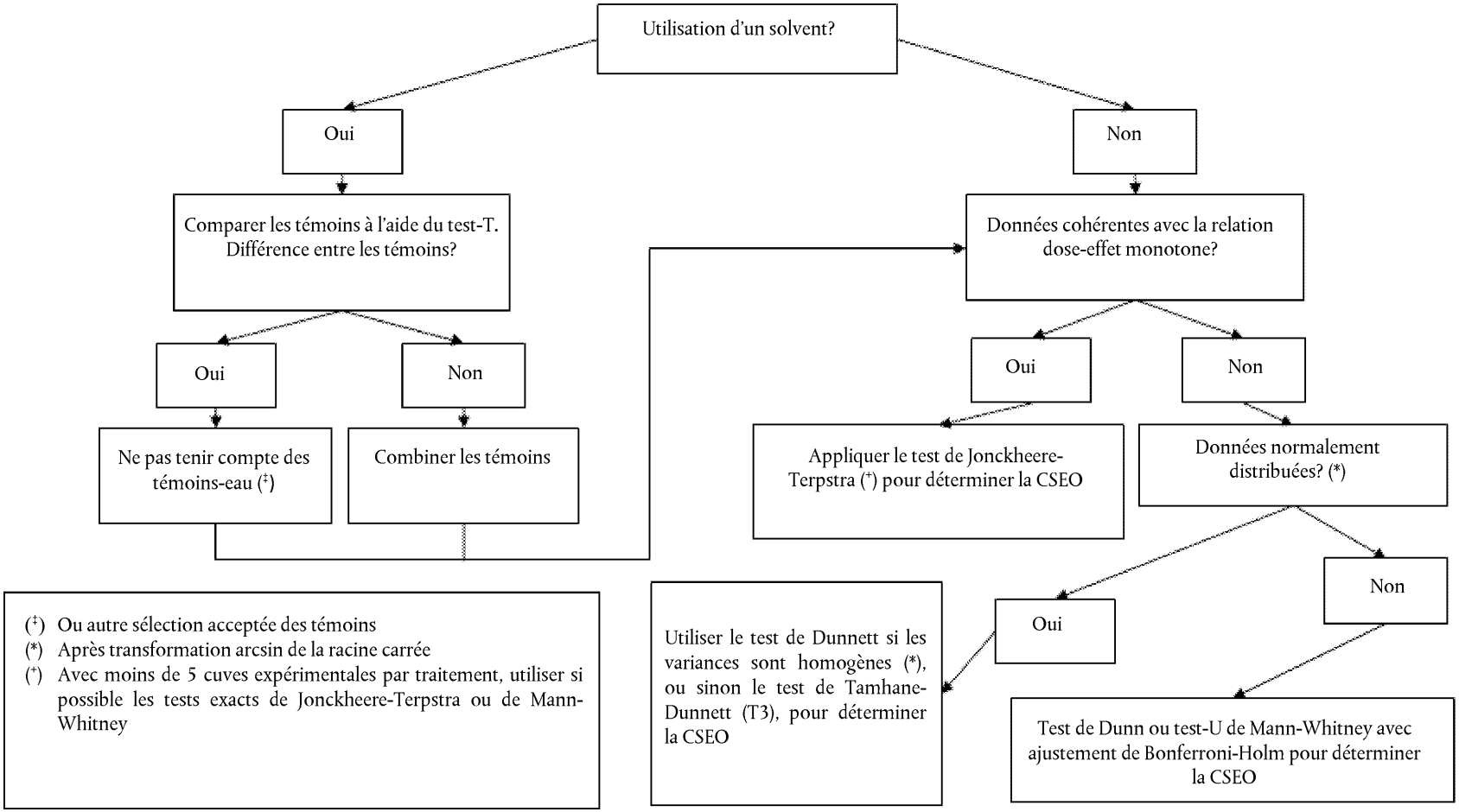
Appendice 8

Diagramme de décision statistique pour l'analyse de la vitellogénine



▼M6

Diagramme de décision statistique pour l'analyse du ratio mâles/femelles



▼M6

Appendice 9

Recommandation pour le prélèvement tissulaire pour la détermination du sexe génétique par réaction en chaîne par polymérase (PCR)

Prélèvement, préparation et stockage des tissus avant détermination du sexe génétique par réaction en chaîne par polymérase (PCR) chez le medaka (préparé par le laboratoire pour les organismes aquatiques de Bayer CropScience AG)

1. Couper la nageoire anale ou dorsale de chaque poisson à l'aide de ciseaux à fine lame et la placer dans un tube rempli de 100 µl de tampon d'extraction 1 (la préparation du tampon est détaillée ci-dessous). Nettoyer les ciseaux après chaque poisson dans un bécher rempli d'eau distillée puis les sécher avec du papier absorbant.

2. Homogénéiser les nageoires avec un pilon de micro-tube en teflon pour lyser les cellules. Pour chaque tube, utiliser un pilon neuf pour éviter toute contamination. Placer les pilons une nuit dans 0,5 M de NaOH, les rincer 5 minutes dans de l'eau distillée puis les conserver dans de l'éthanol ou en milieu stérile après passage en autoclave jusqu'à utilisation.

3. Il est également possible de stocker les nageoires sans tampon d'extraction 1 sur de la glace carbonique puis dans un réfrigérateur à une température de – 80 °C pour éviter toute dégénérescence de l'ADN. Néanmoins, l'extraction se fait mieux si l'on extrait l'ADN simultanément (pour la manipulation, voir ci-dessus; décongeler les échantillons sur de la glace après conservation à une température de – 80 °C avant de remplir les tubes de tampon).

4. Après avoir homogénéisé tous les tubes, les mettre au bain-marie puis les porter à ébullition pendant 15 minutes à une température de 100 °C.

5. Remplir chaque tube de 100 µl de tampon d'extraction 2 (la préparation du tampon est détaillée ci-dessous) à l'aide d'une pipette. Conserver les échantillons à température ambiante pendant 15 minutes et, pendant ce temps, les remuer délicatement de temps en temps avec la main.

6. Remettre ensuite tous les tubes au bain-marie puis les porter de nouveau à ébullition pendant 15 minutes à une température de 100 °C.

7. En attendant l'analyse plus approfondie, congeler les tubes à – 20 °C.

Préparation des tampons:

Tampon 1 utilisé pour la réaction PCR:

500 mg de N-Lauroylsarcosine (Merck KGaA, Darmstadt, GE, par exemple)

2 ml 5M de NaCl

ajouter 100 ml d'eau distillée

→ autoclaver

Tampon 2 utilisé pour la réaction PCR:

20 g de Chelex (Biorad, Munich, GE, par exemple)

Gonfler dans 100 ml d'eau distillée

→ autoclaver

Détermination du sexe génétique (par PCR) chez le medaka (préparé par le laboratoire pour les organismes aquatiques de Bayer CropScience AG et Biozentrum de l'université de Würzburg)

Décongeler les tubes préparés et congelés (tel que décrit dans la partie précédente) sur de la glace. Ensuite, centrifuger les tubes avec une centrifugeuse Eppendorf (30 sec à vitesse maximale, à température ambiante). Pour la PCR, utiliser le surnageant clair séparé du précipité. Veiller absolument à ce qu'aucune trace de Chelex (situé dans le précipité) ne soit transférée vers la réaction PCR, car cela provoquerait des interférences avec l'activité de la Taq polymérase. Utiliser directement le surnageant ou le congeler (à – 20 °C) puis le faire de nouveau décongeler suivant plusieurs cycles sans effet négatif sur l'ADN pour les analyses ultérieures.

▼**M6**

1. *Préparation du «mélange réactif» (25 µl par échantillon):*

	Volume	Concentration finale
Modèle d'ADN	0,5µl-2µl	
tampon 10x pour PCR avec $MgCl_2$	2,5µl	1x
Nucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4µl (5mM)	200µM
Amorce sens (10 µM) (voir ci-dessous 3-5)	0,5µl	200nM
Amorce anti-sens (10 µM) (voir ci-dessous 3-5)	0,5µl	200nM
DMSO	1,25µl	5 %
Eau (classe PCR)	jusqu'à 25 µl	
Taq E- Polymérase	0,3µl	1,5U
Tampon 10x pour PCR avec $MgCl^2$: 670 mM de Tris/HCl (pH 8,8 à 25 °C), 160 mM de $(NH_4)_2SO_4$, 25 mM de $MgCl_2$, 0,1 % de Tween 20		

Pour chaque PCR (voir ci-dessous 3-5), on a besoin de l'amorce spéciale comme nouvelle combinaison de «mélange réactif» et du volume adéquat nécessaire de modèle d'ADN pour chaque échantillon (voir ci- dessus). Les volumes respectifs seront transférés dans de nouveaux tubes à l'aide de pipettes. Les tubes seront ensuite fermés, agités (10 s environ) et centrifugés (10 s à température ambiante). À ce moment, les programmes de PCR respectifs pourront être initiés. De plus, un témoin positif (échantillon d'ADN servant d'exemple, dont l'activité est connue et les résultats sont clairs) et un témoin négatif (1 µl d'eau distillée) seront utilisés dans chaque programme de PCR.

2. *Préparation du gel d'agarose (1 %) — Pendant le fonctionnement des programmes de PCR:*

— Dissoudre 3 g d'agarose dans 300 ml de solution tampon TAE 1 × (gel d'agarose 1 %)

— Porter cette solution à ébullition aux micro-ondes (2-3 min environ)

— Transférer la solution chaude dans un moule spécial posé sur de la glace

— Au bout de 20 minutes environ, le gel d'agarose est prêt à l'emploi

— Stocker le gel d'agarose dans la solution tampon TAE 1 × jusqu'à la fin des programmes de PCR

3. *Programme de PCR pour actines:*

Cette réaction PCR vise à démontrer que l'ADN présent dans l'échantillon n'est pas détérioré.

— Amorce spécifique:

«M act 1(upper/forward)» → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

«M act 2(lower/reverse)» → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

— Programme:

5 min à 95 °C

Cycle (35 fois):

Dénaturation → 45 sec à 95 °C

Hybridation → 45 sec à 56 °C

Élongation → 1 min à 68 °C

15 min à 68 °C

▼**M6**

4. *Programme de PCR pour gènes X et Y:*

Les échantillons dont l'ADN est intact seront utilisés dans ce programme de PCR pour détecter les gènes X et Y. L'ADN des mâles comporte une double bande et l'ADN des femelles une seule bande (après coloration et électrophorèse sur gel d'agarose). Si l'on utilise ce programme, on intégrera un témoin positif pour les mâles (échantillon XY) et un pour les femelles (échantillon XX).

— Amorce spécifique:

«PG 17.5» (upper/forward) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

«PG 17.6» (lower/reverse) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Programme:

5 min à 95 °C

Cycle (40 fois):

Dénaturation	→ 45 sec à 95 °C
Hybridation	→ 45 sec à 55 °C
Élongation	→ 1 min 30 sec à 68 °C

15 min à 68 °C

5. *Programme de PCR pour gènes Y servant de «témoin» pour le programme de PCR pour gènes X et Y:*

Ce programme permet de vérifier les résultats du «programme de PCR pour gènes X et Y». Les «échantillons mâles» doivent comporter une bande et les «échantillons femelles» ne doivent en comporter aucune (après coloration et électrophorèse sur gel d'agarose).

— Amorce spécifique:

«DMTYa (upper/forward)» → GGC CGG GTC CCC GGG TG

«DMTYd (lower/reverse)» → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Programme:

5 min à 95 °C

Cycle (40 fois):

Dénaturation	→ 45 sec à 95 °C
Hybridation	→ 45 sec à 56 °C
Élongation	→ 1 min à 68 °C

15 min à 68 °C

6. *Coloration des échantillons de PCR:*

Solution de coloration:

50 % de glycérol

100 mM d'EDTA

1 % de SDS

0,25 % de bleu de bromophénol

0,25 % de xylène cyanol

Verser 1 µl de cette solution dans chaque tube à l'aide d'une pipette.

7. *Début de l'électrophorèse sur gel d'agarose:*

— Transférer la préparation de gel d'agarose 1 % dans une enceinte d'électrophorèse sur gel remplie de tampon TAE 1x

— Verser 10-15 µl de chaque échantillon de PCR coloré dans une fente de gel d'agarose à l'aide d'une pipette

— Verser 5-15 µl de 1kb-«Ladder» (Invitrogène) dans une fente séparée à l'aide d'une pipette

— Commencer l'électrophorèse avec 200 V

— Arrêter au bout de 30-45 min

▼**M6**

8. *Détermination des bandes:*

— Nettoyer le gel d'agarose avec de l'eau distillée.

— Transférer le gel d'agarose dans du bromure d'éthidium pendant 15-30 min —

— Photographier le gel d'agarose exposé à des rayonnements ultra-violets

— Analyser les échantillons en les comparant à la bande/aux bandes témoin(s) positive(s) et à l'échelle

▼M6

Appendice 10

Guide de prélèvement tissulaire pour la détermination du sexe génétique par réaction en chaîne par polymérase chez l'épinoche

Prélèvement tissulaire et extraction de l'ADN

L'ADN peut être extrait au moyen d'une variété de réactifs disponibles dans le commerce, et en utilisant des procédés d'extraction manuelle ou automatique. Le protocole utilisé au laboratoire CEFAS de Weymouth est décrit ci-dessous, et des méthodes alternatives ont été ajoutées dans certains cas.

1. Au moyen de ciseaux fins, un petit morceau tissulaire (10-20 mg) de la partie dorso-latérale (après prélèvement de la tête et de la queue pour la mesure de la vitellogénine) est prélevé de chaque poisson individuellement. Le tissu est placé dans un tube et soit directement placé dans l'azote liquide (conservation à – 80 °C), soit rempli par de l'éthanol à 70 % (pour un transport et une conservation à 4 °C). Les ciseaux sont nettoyés après chaque dissection de poisson individuellement dans de l'éthanol à 70 %, puis trempés dans de l'eau distillée avant d'être séchés sur du papier absorbant.

2. L'éthanol (en cas de présence) est ôté par aspiration et le tissu est digéré du jour au lendemain avec de la protéinase K dans 400 µl de tampon ATL (Qiagen). Un aliquot (200 µl du produit de cette digestion est transféré dans un S-Block (Qiagen) de 96 puits, et l'ADN extrait dans un format de 96 puits utilisant le BioRobot Universel Qiagen et le kit Qlamp Investigator BioRobot. L'ADN est élué dans 50 µl d'une une eau exempte de DNAse et de RNAse. Dans le cas ou il est fait usage de prélèvements tissulaires durs pour extraire l'ADN (tel que le rachis ou la nageoire pectorale) il peut s'avérer nécessaire d'homogénéiser l'échantillon dans le tampon de lyse au moyen d'un lyseur de tissu FastPrep® ou un système équivalent de rupture des tissus.

   Alternativement,

   a. L'échantillon tissulaire est digéré du jour au lendemain avec la protéinase K dans 400 µl de tampon de lyse G2 (Qiagen) et l'ADN est extrait de 200 µl du produit de digestion en utilisant soit le kit EZ-1 DNA easy tissue et le Biorobot EZ-1, ou alors le mini kit DNA easy tissue. L'ADN est élué dans un volume de 50 µl.

   b. Les prélèvements tissulaires sont soumis au réactif DNAzol. Les prélèvements sont rapidement lysés dans 1 ml de DNAzol pendant 10 min dans un tube de 1,5 ml à l'intérieur d'une centrifugeuse, suivi d'une centrifugation à 13 000 rpm pendant 5 min afin d'enlever toutes les particules. L'échantillon lysé est ensuite transféré dans un nouveau tube de centrifugation de 1,5 ml contenant 500 µl d'éthanol à 100 %, puis centrifugé à 13 000 rpm pendant 10 min pour précipiter l'ADN. L'éthanol est enlevé et remplacé par 400 µl d'éthanol à 70 %, puis centrifugé à 13 000 rpm pendant 5 min et le culot d'ADN est dissous dans 50 µl d'eau exempte d'ADNase et de RNAse. A nouveau, dans le cas ou il est fait usage de prélèvements tissulaires durs pour extraire l'ADN (tel que le rachis ou la nageoire pectorale) il peut s'avérer nécessaire d'homogénéiser l'échantillon dans le tampon de lyse au moyen d'un lyseur de tissu FastPrep® ou un système équivalent de rupture des tissus, préalablement à l'extraction d'ADN.

3. L'ADN est stocké à – 20 °C jusqu'à utilisation.

Note importante: des gants sont portés lors des manipulations

Analyse par réaction en chaîne de la polymérase (PCR)

Les amplifications ont été réalisées au moyen de 2,5 µl d'extrait d'ADN dans un volume réactionnel de 50 µl et en utilisant le Idh locus primers (comme décrit par Peichel et al, 2004. Current biology 1:1416- 1424):

Amorce sens:	5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'
Amorce antisens:	5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

▼**M6**

Il existe un grand nombre de fournisseurs de réactifs appropriés pour l'analyse PCR. La méthode décrite ci-dessous est celle actuellement utilisée au laboratoire CEFAS de Weymouth.

1. *Préparation du «mélange réactif» (50 µl par échantillon):*

Un mastermix est préparé comme suit. Celui-ci peut être préparé à l'avance et conservé à – 20 °C jusqu'à utilisation. Préparer une quantité de mastermix suffisante pour un contrôle négatif (eau de qualité biologie moléculaire uniquement).

	Volume (concentration du stock)/échantillon	Concentration finale
5xGoTaq® Tampon de réaction	10µl	1x
$MgCl_2$	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Nucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (25 mM chaque)	250 µM chaque
Amorce sens	0,5µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Amorce anti-sens	0,5µl (0,1 nmol/µl)	2,0µM
Eau (qualité biologie moléculaire)	30,75 µl	
GoTaq Polymérase	0,25 µl	1,25U

— Déverser 47,5 µl dans un tube à paroi fine de PCR étiqueté 0,5 ml

— Ajouter 2,5 µl d'ADN purifié dans le tube étiqueté approprié Répéter l'opération pour tous les échantillons et le contrôle négatif;

— Ajouter par-dessus 2 gouttes d'huile minérale Alternativement, utiliser un cycleur thermal à couvercle chauffant

— Fermer les couvercles

— Les échantillons ont été dénaturés dans un cycleur thermal Peltier PTC-225 à 94 +/– 2 °C pendant 5 minutes, suivi de 39 cycles de 94 +/– 2 °C pendant 1 minute, 55 +/– 2 °C pendant 1 minute, 72 +/– 2 °C pendant 1 minute, et une extension finale à 72 +/– 2 °C pendant 10 minutes.

2. *Préparation du gel d'agarose (2 %):*

Traditionnellement les produits de la PCR sont résolus sur gel d'agarose à 20 % contenant du bromure d'éthidium.

Des systèmes d'électrophorèse capillaires peuvent également être utilisés.

— Peser 2g d'agarose dans 100 ml de tampon TAE 1×

— Chauffer dans un four à micro-onde (environ 2-3 minutes) pour dissoudre l'agarose

— Ajouter 2 gouttes de bromure d'éthidium pour atteindre la concentration finale de 0,5 µg/ml

— Transférer la solution encore chaude dans l'équipement de prise du gel

— Attendre que le gel durcisse.

3. *Electrophorèse sur gel:*

— Transférer le gel d'agarose dans l'appareil d'éléctrophorèse et immerger dans le tampon de TAE 1×

— Charger 20 µl de chaque échantillon dans un puits séparé, en ajoutant un marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN de 100pb, Promega) dans un puits à part

— Effectuer l'électrophorèse à 120 V pendant 30-45 minutes.

▼**M6**

4. *Visualisation des produits d'amplification*

Si le bromure d'éthidium a été incorporé dans le gel d'agarose comme décrit ci-dessus, les produits d'ADN sont visualisés sous une source d'UV. Alternativement, le gel d'agarose est coloré en couvrant le gel par une solution diluée de bromure d'éthidium (0,5 μg/ml dans de l'eau) pendant 30 minutes avant de pouvoir visualiser

▼M6

Appendice 11

Guide pour la procédure de fertilisation artificielle chez l'épinoche

Le but de cette section est de décrire la procédure pour obtenir des œufs d'épinoche fertilisés pour leur utilisation dans l'essai de développement sexuel.

Procédures

Recueil de sperme chez les mâles

1. Un mâle bien coloré de la population est euthanasié.

2. Les testicules sont disséqués de chaque côté du poisson. *Les testicules sont généralement très pigmentés, de forme allongée facilement visibles depuis la ligne médiane latérale du corps*. Utiliser l'une des méthodes suivantes:

3. Utiliser une paire de ciseaux fins, commencer à ouvrir depuis le cloaque et faire une incision de 1- 1,5 cm avec une petite entaille à 45°.

4. Utiliser le scalpel pour faire une petite incision sur le côté du poisson légèrement postérieure au pelvis et ventralement par rapport aux plaques latérales.

5. Les testicules sont enlevés au moyen de forceps fins et placés dans une boîte de pétri.

6. Chaque testicule est recouvert de 100 µl de **solution de Hank** (*) fraîchement préparée.

7. Les testicules sont finement coupés en dés au moyen d'un scalpel ou d'une lame de rasoir. Ceci permet la libération de sperme et donne à la solution de Hank un aspect laiteux.

8. Le fluide contenant le sperme est placé dans un tube; il faut veiller à ne pas introduire de tissu testiculaire lors du pipetage.

9. 800 µl de solution de Hank sont ajoutés dans le tube et bien mélangés.

10. Si nécessaire, le mâle peut être préservé par fixation dans de l'éthanol à 100 % ou un autre produit de fixation. Cela est particulièrement important si l'étude vise à assigner une origine parentale à la descendance.

Note importante: *Bien que la totalité de la solution-mère requise puisse être préparée à l'avance, le* ***stock N° 5*** *et consécutivement la* ***solution finale*** *sont* ***fraîchement*** *préparés le jour même.*

Stock N° 1	
NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Eau distillée	100 ml
Stock N° 2	
Na_2HPO_4 (anhydre)	0,358 g
KH_2PO_4	0,60 g
Eau distillée	100 ml
Stock N° 3	
$CaCl_2$	0,72 g
Eau distillée	50 ml

(*) Solution salée tamponnée de Hank (HBSS):

HBSS est nécessaire pour préserver le sperme dans le cadre d'une fertilisation.

▼M6

Stock N° 4

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,23 g
Eau distillée	50 ml

Stock N° 5 (fraîchement préparé)

$NaHCO_3$	0,35 g
Eau distillée	10 ml

Note: Si vous avez déjà certains de ces sels mais avec un contenu aqueux différent (p.e. 2 H_2O au lieu de la forme anhydre), vous pouvez faire usage de ceux-ci mais il faut au préalable ajuster le poids en fonction du poids moléculaire.

Pour la solution finale de Hank, combiner les stocks de la façon suivante:

Stock 1	1,0 ml
Stock 2	0,1 ml
Stock 3	0,1 ml
Eau distillée	8,6 ml
Stock 4	0,1 ml
Stock 5	0,1 ml

Bien mélanger avant utilisation.

Fertilisation

1. Les femelles gravides, grosses, sont identifiées dans la population choisie; les femelles sont prêtes à être pressées seulement quand les œufs sont visiblement protubérants à partir du cloaque. Les femelles prêtes prennent une posture caractéristique avec la tête haute.

2. Passer doucement un doigt le long du poisson vers la queue pour faciliter l'expulsion d'un paquet d'œufs dans une boîte de Pétri propre. Répéter l'opération de l'autre côté et replacer le poisson dans l'aquarium.

3. Les œufs peuvent être étalés en couche à l'aide d'un pinceau fin. Il est important d'essayer d'exposer un grand nombre d'œufs au sperme, et donc il faut maximiser la surface de l'œuf en contact avec le sperme. Note importante: Garder les œufs humides en posant un tissu imbibé sur eux (il est important que les œufs ne soient pas au contact direct de l'eau car ceci pourrait durcir le chorion prématurément et ainsi empêcher la fertilisation). Il y a des variations importantes du nombre d'œufs qu'une femelle peut produire, mais en moyenne, environ 150 œufs peuvent être obtenus à partir d'une seule femelle gravide.

4. 25 µl de sperme dans le mélange de Hank sont répandus de manière uniforme sur la totalité des œufs à l'aide du pinceau. Les œufs vont rapidement durcir et changer de couleur (en l'espace d'une minute) une fois que la fertilisation a commencé. Si le nombre estimé d'œufs est supérieur à 150, répéter la procédure. Aussi, si les œufs ne durcissent pas après une minute, ajouter un peu plus de sperme. Note importante: l'ajout de sperme n'améliore pas forcément le taux de fertilisation.

5. Les œufs et la solution spermatique sont laissés en contact pour «interagir» pendant au moins 15 minutes et les œufs fertilisés peuvent être placés dans l'aquarium ou a lieu l'exposition à la substance chimique d'essai dans les 90 minutes qui suivent la fertilisation.

6. La procédure est répétée avec une autre femelle jusqu'à ce que le nombre d'œufs collectés soit suffisant.

7. Préserver quelques œufs du dernier lot et fixer ces œufs dans de l'acide acétique à 10 %.

▼**M6**

Dénombrement et répartition des œufs dans les aquariums d'essai

1. Les œufs sont répartis également entre chaque groupe de traitement pour éviter tout biais génétique. Chaque lot d'œufs fertilisés est séparé en groupes de taille égale (autant que de groupes de traitement) en utilisant un instrument pointu (i.e. un forceps d'entomologie à large lame ou une boucle d'inoculation). Pour 4 réplicats par traitement, contenant chacun 20 œufs, 80 œufs sont répartis par aquarium d'exposition. Note importante: il est conseillé d'ajouter 20 % d'œufs en plus (i.e. 96 œufs par groupe de traitement) jusqu 'à ce que l'on soit sûr d'obtenir des pourcentages de fertilisation de 100 %.

2. Les œufs d'épinoche sont enclins aux infections fongiques en dehors du nid gardé par le père. A cet égard, le traitement de tous les œufs avec du bleu de méthylène pendant les 5 premiers jours de l'essai est extrêmement important. Une solution mère de bleu de méthylène à 1 mg/ml est ajoutée aux aquariums d'exposition pour donner une concentration finale maximum de 2,125 mg/l. Note importante: les épinoches ne sont pas exposées au bleu de méthylène après éclosion et le système est sans méthylène à partir du 6ème jour.

3. Les œufs sont inspectés chaque jour et tout œuf mort ou non fertilisé est enregistré come tel. Note importante: Les œufs ne sont jamais hors de l'eau jusqu'à l'éclosion, même pendant un temps très court.

▼M6

C.42. BIODÉGRADABILITÉ DANS L'EAU DE MER

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 306 (1992) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Quand les premières méthodes d'essai ont été mises au point, on ignorait dans quelle mesure on pouvait appliquer à l'environnement marin les résultats des essais de screening pour la biodégradabilité facile utilisant de l'eau douce et des inocula constitués d'effluents secondaires de station d'épuration ou de boue activée. Il existe dans ce domaine des résultats variables [entre autres (1)].

2. De nombreuses eaux de rejet industriel contenant divers produits chimiques atteignent la mer, soit par déversement direct, soit par le chemin d'estuaires et de rivières dans lesquels les temps de séjour sont faibles comparés à la durée nécessaire à la biodégradation complète d'un grand nombre des produits chimiques présents. C'est à cause de la prise de conscience grandissante de la nécessité de protéger le milieu marin contre des charges croissantes de produits chimiques et de la nécessité d'évaluer la concentration probable des produits chimiques dans la mer, que des méthodes d'essai ont été élaborées afin d'évaluer la biodégradabilité dans l'eau de mer.

3. Les méthodes décrites ici utilisent l'eau de mer naturelle à la fois comme phase aqueuse et comme source de microorganismes. Afin de se conformer aux méthodes de biodégradabilité facile en eau douce, on a étudié l'utilisation d'eau de mer ultrafiltrée et centrifugée, ainsi que l'utilisation de sédiments marins comme inocula. Ces recherches n'ont donné aucun résultat. Le milieu d'essai est donc constitué par de l'eau de mer naturelle prétraitée afin d'en éliminer les grosses particules.

4. Afin de déterminer la biodégradabilité ultime par la méthode du flacon agité, on doit utiliser des concentrations relativement élevées de substance d'essai à cause de la faible sensibilité de la méthode d'analyse du carbone organique dissous (COD). Ceci en retour nécessite d'ajouter à l'eau de mer des substances nutritives minérales (N et P), sinon leur faible concentration limiterait la disparition du COD. Il est également nécessaire d'ajouter des substances nutritives dans la méthode de la fiole fermée à cause de la concentration de la substance d'essai ajoutée.

5. Ces méthodes ne sont donc pas des essais de biodégradabilité facile puisqu'on ne rajoute pas d'inoculum en plus des microorganismes déjà présents dans l'eau de mer. Ces essais ne simulent pas non plus l'environnement marin, puisqu'on y ajoute des substances nutritives et que la concentration de la substance d'essai est beaucoup plus élevée que celle qu'on trouve dans la mer. C'est pourquoi on propose de classer ces méthodes dans une nouvelle section qui s'intitule «Biodégradabilité dans l'eau de mer».

APPLICATION

6. Les résultats des essais qui sont effectués parce que les conditions d'utilisation et de rejet de la substance en question indiquent un cheminement vers la mer, donnent une première indication de sa biodégradabilité dans l'eau de mer. Si le résultat est positif (disparition du COD > 70 %; demande théorique en oxygène DThO > 60 %), on peut conclure qu'il existe une potentialité pour que le produit subisse une biodégradation dans l'environnement marin. Cependant, un résultat négatif ne permet pas d'exclure une telle éventualité, mais indique que des études supplémentaires sont nécessaires, par exemple, en utilisant une concentration de substance d'essai aussi faible que possible.

▼M6

7. Dans les deux cas, si on désire une valeur plus précise du taux ou du degré de biodégradation dans l'eau de mer, à un endroit particulier, on devra appliquer d'autres méthodes plus complexes et plus sophistiquées, et de là plus couteuses. On pourrait par exemple effectuer un essai de simulation en utilisant une concentration de la substance d'essai plus proche de la concentration probable dans l'environnement. On pourrait également utiliser une eau de mer non fortifiée, non prétraitée, prélevée sur les lieux à étudier, et la dégradation primaire pourrait être suivie par une analyse chimique spécifique. Pour la biodégradabilité ultime, il serait nécessaire d'utiliser des substances marquées au ^{14}C afin de pouvoir mesurer les taux de disparition du ^{14}C organique soluble et de formation de $^{14}CO_2$ à des concentrations proches de celles qui règnent dans l'environnement.

CHOIX DES MÉTHODES

8. Le choix de la méthode à utiliser dépend d'un certain nombre de facteurs; le tableau suivant aide à faire ce choix. Alors que les substances chimiques dont la solubililité est inférieure à une valeur équivalente à environ 5 mg/l de C ne peuvent pas être testées par la méthode du flacon agité, au moins en principe, ces substances peu solubles peuvent être testées par la méthode de la fiole fermée.

Tableau

Avantages et inconvénients de la méthode du flacon agité et de la méthode de la fiole fermée

MÉTHODE	AVANTAGES	INCONVÉNIENTS
FLACON AGITÉ	— matériel simple sauf pour l'analyseur de C — une durée de 60 jours n'est pas un problème — pas d'interférence avec la nitrification — peut être adaptée pour les substances volatiles	— nécessite un analyseur de C — les utilisations de 5-40 mg/l de COD peuvent être inhibitrices — la détermination du COD est difficile pour de faibles concentrations dans l'eau de mer (effet chlorure) — le COD est parfois élevé dans l'eau de mer
FIOLE FERMÉE	— matériel simple — détermination finale simple — utilise de faibles concentrations de la substance d'essai (2 mg/l), ce qui réduit les chances d'inhibition — facilement adaptée pour les substances volatiles	— il pourrait être difficile de maintenir l'étanchéité à l'air des flacons — la croissance des bactéries sur les parois peut conduire à des valeurs fausses — les valeurs de la consommation d'O_2 dans le témoin peuvent être élevées, en particulier après 28 j.; pourrait être supprimée en faisant vieillir l'eau de mer — interférence possible avec la consommation d'O_2 par la nitrification

MÉTHODE DU FLACON AGITÉ

INTRODUCTION

1. Cette méthode est une variante pour l'eau de mer de l'essai de screening modifié décrit au chapitre C.4B de la présente annexe (2). Elle a été mise au point à la suite d'un essai circulaire organisé pour la Commission européene (CE), par l'Institut Danois de la Qualité de l'Eau (3).

2. De la même façon que pour la méthode de la fiole fermée en milieu marin, qui l'accompagne, les résultats de cet essai ne doivent pas être considérés comme des indicateurs de la biodégradabilité facile, mais ils doivent être utilisés de façon spécifique pour obtenir des informations sur la biodégradabilité des substances en milieu marin.

▼**M6**

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

3. Une quantité prédéterminée de substance d'essai est dissoute dans le milieu d'essai de façon à obtenir une concentration en carbone organique dissous (COD) comprise entre 5 et 40 mg/l. Si on améliore les limites de sensibilité de l'analyse du carbone organique, il peut être avantageux d'utiliser des concentrations plus faibles de substance d'essai, en particulier dans le cas des substances inhibitrices La solution de la substance à étudier dans le milieu d'essai est incubée sous agitation dans l'obscurité ou en lumière diffuse, dans des conditions aérobies, à une température donnée (contrôlée à ± 2 °C près) normalement comprise entre 15 et 20 °C. Dans les cas où l'objectif de l'étude est de simuler des situations réelles de l'environnement, les essais peuvent être effectués en dehors de cet intervalle normal de température. La durée d'essai maximale recommandée est d'environ 60 jours. La dégradation est suivie par des mesures du COD (dégradation ultime) et, dans certains cas, par des analyses spécifiques (dégradation primaire).

INFORMATION SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

4. Afin de savoir si on peut appliquer cet essai à une substance particulière, on doit connaître certaines de ses propriétés. La teneur en carbone organique de la substance doit être connue, sa volatilité doit être telle qu'il ne se produise pas de pertes importantes au cours de l'essai, enfin, sa solubilité dans l'eau doit être supérieure à une valeur équivalente à une concentration de 25 à 40 mg/l de C. La substance d'essai ne doit pas non plus s'adsorber de façon importante sur les surfaces de verre. Il est nécessaire de disposer d'informations sur la pureté ou les proportions relatives des principaux constituants de la substance étudiée afin de pouvoir interpréter les résultats obtenus, en particulier quand ceux-ci se situent près du niveau «seuil».

5. Des informations sur la toxicité de la substance d'essai vis à vis des bactéries recueillies, par exemple dans des essais à court terme sur le taux de respiration (4), peuvent s'avérer utiles pour choisir les concentrations d'essai appropriées et elles peuvent être essentielles pour interpréter correctement de faibles valeurs de biodégradation. Cependant, de telles informations ne sont pas toujours suffisantes pour interpréter les résultats obtenus dans l'essai de biodégradation, et la méthode décrite dans le paragraphe 18 est plus adaptée.

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

6. On doit utiliser des substances de référence adéquates pour contrôler l'activité microbienne de l'échantillon d'eau de mer. Le benzoate de sodium, l'acétate de sodium et l'aniline peuvent par exemple être utilisés. Les substances de référence doivent se dégrader dans un laps de temps relativement court, sinon il est recommandé de recommencer l'essai en utilisant un autre échantillon d'eau de mer.

7. Dans l'essai circulaire de la CE où les échantillons d'eau de mer étaient prélevés à différents endroits et à différentes périodes de l'année (3), la phase de latence (t_L) et le temps nécessaire après la phase de latence pour atteindre 50 % de dégradation (t_{50}), étaient pour le benzoate de sodium respectivement de 1 à 4 jours et de 1 à 7 jours. Pour l'aniline, les valeurs étaient comprises entre 0 et 10 jours pour la t_L et entre 1 et 10 jours pour la t_{50}.

REPRODUCTIBILITÉ ET SENSIBILITÉ DE LA MÉTHODE

8. La reproductibilité de la méthode a été établie dans l'essai circulaire (3). La concentration la plus faible de la substance d'essai pour laquelle cette méthode peut être utilisée est déterminée dans une large mesure, par la limite de détection de l'analyse du carbone organique (à l'heure actuelle, environ 0,5 mg/l de C) et par la concentration du carbone organique dissous dans l'eau de mer utilisée (habituellement de l'ordre de 3 à 5 mg/l pour l'eau du large). La concentration de base en COD ne doit pas dépasser environ 20 % de la concentration totale en COD après addition de la substance d'essai. Si ceci n'est pas possible, la concentration de base en COD

▼M6

peut parfois être réduite en faisant vieillir l'eau de mer avant l'essai. Si la méthode est utilisée seulement avec une analyse chimique spécifique (qui mesure la dégradation primaire) l'investigateur doit rechercher à l'aide d'informations supplémentaires, si la dégradabilité ultime peut être atteinte. Ces informations additionnelles peuvent être apportées par les résultats d'autres essais de biodégradabilité facile ou intrinsèque.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

9. Matériel courant de laboratoire et:

   a. Dispositif d'agitation pouvant recevoir des erlenmeyers de 0,5 à 2 litres, soit équipé d'un dispositif de contrôle de la température, soit fonctionnant dans une pièce thermostatée entre 15 et 20 °C à ± 2 °C près;

   b. Des erlenmeyers de 0,5 à 2 litres à col étroit;

   c. Un appareil de filtration sur membrane ou une centrifugeuse;

   d. Des membranes filtrantes d'une porosité de 0,2 à 0,45 μm;

   e. Un analyseur de carbone;

   f. Un équipement pour des analyses spécifiques (facultatif).

Eau de mer

10. Prélever un échantillon d'eau de mer dans un récipient soigneusement nettoyé et le transporter au laboratoire, de préférence dans un intervalle de un à deux jours après le prélèvement. Au cours du transport, ne pas laisser la température de l'échantillon dépasser de façon importante la température qui sera utilisée dans l'essai. Identifier précisément l'endroit du prélèvement, décrire son état de pollution et indiquer les substances nutritives qu'on y trouve. En particulier pour les eaux côtières, inclure dans cette caractérisation un comptage des colonies bactériennes hétérotrophes et la détermination des concentrations en nitrate, ammonium et phosphate dissous.

11. Pour l'échantillon d'eau de mer, fournir les informations suivantes:

   — date du prélèvement;

   — profondeur du prélèvement;

   — aspect de l'échantillon — trouble, etc.;

   — température au moment du prélèvement;

   — salinité;

   — COD;

   — délai entre le prélèvement et l'utilisation dans l'essai.

12. Si l'on trouve que le taux de COD de l'échantillon d'eau de mer est élevé (paragraphe 8), il est recommandé de faire vieillir cet échantillon pendant environ une semaine avant son utilisation. Le vieillissement se fait en conservant l'échantillon dans des conditions aérobies à la température de

▼M6

l'essai, dans l'obscurité ou en lumière diffuse. Si nécessaire, les conditions aérobies sont maintenues par une légère agitation. Au cours du vieillissement, la teneur en matière organique facilement dégradable diminue. Dans l'essai circulaire (3), on a trouvé aucune différence entre le potentiel de dégradation d'échantillons d'eau de mer vieillis ou fraîchement recueillis. Avant son utilisation, prétraiter l'eau de mer afin d'en éliminer les grosses particules, par exemple par filtration sur un filtre de nylon ou sur du gros papier filtre (pas de membranes filtrantes ou de filtres GF-C), ou par sédimentation et décantation. On doit mentionner le procédé utilisé. Si l'échantillon est vieilli, effectuer le prétraitement après vieillissement.

Solutions mères des substances nutritives minérales

13. Préparer les solutions-mères suivantes en utilisant des réactifs de qualité pour analyse.

a) Dihydrogénophosphate monopotassique, KH_2PO_4 8,50 g

Hydrogénophosphate dipotassique, K_2HPO_4 21,75 g

Hydrogénophosphate disodique dihydraté, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 33,30 g

Chlorure d'ammonium, NH_4Cl 0,50 g

Dissoudre et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.

b) Chlorure de calcium anhydre, $CaCl_2$ 27,50 g

Dissoudre et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.

c) Sulfate de magnésium heptahydraté, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 22,50 g

Dissoudre et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.

d) Chlorure de fer (III) hexahydraté, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,25 g

Dissoudre et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.

On peut éviter la précipitation de la solution (d) en ajoutant une goutte d'HCl concentré ou 0,4 g d'acide éthylènediamine-tétraacétique (sel disodique de l'EDTA). S'il se forme un précipité dans une solution-mère, la remplacer par une solution fraîchement préparée.

Préparation du milieu d'essai

14. Ajouter 1 ml de chacune des solutions-mères ci-dessus par litre d'eau de mer prétraitée.

Inoculum

15. Ne pas ajouter d'inoculum spécifique, en plus des micro-organismes déjà présents dans l'eau de mer. Déterminer (facultativement) le nombre d'hétérotrophes formant colonies présents dans le milieu d'essai contenant l'eau de mer (et de préférence également dans les échantillons d'eau de mer du départ) par exemple par comptage sur boîte, en utilisant de l'agar marin. Ceci est particulièrement souhaitable pour les échantillons provenant de zones côtières ou polluées. Contrôler l'activité microbienne hétérotrophe dans l'eau de mer en effectuant un essai avec une substance de référence.

▼M6

Préparation des flacons

16. S'assurer que toute la verrerie est parfaitement nettoyée, mais pas nécessairement stérile, (par exemple en utilisant de l'acide chlorhydrique alcoolique), qu'elle est rincée et séchée avant utilisation afin d'éviter toute contamination par des résidus d'expériences précédentes. Les flacons doivent également être nettoyés avant un premier usage.

17. Travailler simultanément avec les substances d'essai dans des flacons en double et avec la substance de référence dans un seul récipient. Effectuer un essai témoin en double, sans substance d'essai ni composé de référence, afin de déterminer les blancs analytiques. Dissoudre les substances d'essai dans le milieu d'essai — il est commode de les ajouter à partir de solution mère concentrée — de façon à obtenir des concentrations de départ qui se situent normalement entre 5 et 40 mg/l de COD. La substance de référence est normalement testée à une concentration de départ correspondant à 20 mg/l de COD. Si on utilise des solutions mères de substances d'essai et/ou de référence, s'assurer que la salinité du milieu contenant l'eau de mer n'a pas été modifiée de façon importante.

18. Si des effets toxiques sont attendus ou si l'on ne peut pas les exclure, il peut s'avérer judicieux d'inclure en double, dans la conception de l'essai, une expérience sur l'inhibition. Ajouter les substances d'essai et de référence dans le même récipient, la concentration de la substance de référence étant normalement celle utilisée dans l'essai témoin qui contrôle la procédure (c'est-à-dire 20 mg/l de COD) afin de pouvoir faire des comparaisons.

19. Verser des quantités adéquates de solutions d'essai dans les erlenmeyers (une quantité acceptable va jusqu'à environ la moitié du volume des récipients), puis recouvrir chaque récipient non hermétiquement (par exemple avec une feuille d'aluminium) de façon à permettre les échanges gazeux entre le flacon et l'air environnant. (Des tampons de coton ne sont pas indiqués si on utilise l'analyse du COD). Placer les récipients sur le dispositif d'agitation et agiter de façon continue à vitesse faible (par exemple 100 t/min) tout au long de l'essai. Maintenir la température constante (entre 15 et 20 °C à ± 2 °C près), et protéger les récipients de la lumière afin d'éviter la croissance d'algues. S'assurer que l'air est exempt de matières toxiques.

Témoin physicochimique (facultatif)

20. Si on s'attend à une dégradation abiotique ou à des mécanismes de perte, tels qu'une hydrolyse (problème qui se pose uniquement en cas d'analyse spécifique), une volatilisation ou une adsorption, il est judicieux de réaliser une expérience témoin physicochimique. Celle-ci peut être effectuée en ajoutant dans les récipients contenant la substance d'essai du chlorure de mercure (II) ($HgCl_2$) ([1]) (entre 50 et 100 mg/l) afin de stopper l'activité microbienne. Une diminution importante du COD ou de la concentration d'une substance spécifique dans l'essai témoin physicochimique, indiquent la présence de mécanismes de disparition abiotiques. (Si on utilise du chlorure de mercure, on doit faire attention aux interférences ou à un empoisonnement catalytique dans l'analyse du COD).

Nombre de flacons

21. Dans un essai type, on utilise les récipients suivants:

Flacons 1 et 2 — contiennent la substance d'essai (suspension d'essai);

Flacons 3 et 4 — contiennent seulement l'eau de mer (témoin inoculum);

Flacon 5 — contient la substance de référence (contrôle de la procédure);

Flacon 6 — contient les substances d'essai et de référence (témoin de toxicité) — facultatif;

Flacon 7 — contient la substance d'essai et l'agent stérilisant (témoin stérile abiotique) — facultatif.

([1]) Le chlorure de mercure (II) ($HgCl_2$) est une substance très toxique qui doit être manipulée avec certaines précautions. Les déchets aqueux contenant ce produit chimique doivent être éliminés de façon appropriée; ils ne doivent pas être jetés à l'égout.

▼M6

Analyse du COD

22. Tout au long de l'essai, à des intervalles de temps appropriés, prélever des échantillons pour l'analyse du COD (Appendice 1). Prélever systématiquement des échantillons au début (jour 0) et à la fin (jour 60) de l'essai. Afin de tracer la courbe de la dégradation en fonction du temps, il est nécessaire de disposer au total, d'au moins cinq échantillons. On ne peut pas établir de calendrier précis pour l'échantillonnage étant donné que le taux de biodégradation varie. Effectuer des déterminations du COD en double pour chaque échantillon.

Prélèvement

23. Le volume requis pour les échantillons dépend de la méthode analytique (analyse spécifique), de l'analyseur de carbone utilisé et de la procédure choisie (filtration sur membrane ou centrifugation) pour le traitement de l'échantillon avant la détermination du carbone (paragraphes 25 et 26). Avant de prélever, s'assurer que le milieu d'essai est bien mélangé et que toute matière adhérant à la paroi du récipient est dissoute ou remise en suspension.

24. Immédiatement après le prélèvement, filtrer sur membrane ou centrifuger. Si nécessaire, conserver les échantillons filtrés ou centrifugés entre 2 et 4 °C pendant au maximum 48 heures ou en dessous de -18 °C sur de plus longues périodes (si on sait que cela n'affectera pas la substance, acidifier à pH 2 avant le stockage).

25. Des membranes filtrantes (0,2 à 0,45 µm), telles que les membranes en polycarbonate, qui ne libèrent pas de carbone ou n'adsorbent pas la substance au cours de la filtration conviennent. Certaines membranes filtrantes sont imprégnées de tensio-actifs pour l'hydrophilisation et elles peuvent libérer des quantités considérables de carbone dissous. Préparer de tels filtres en les faisant bouillir dans de l'eau désionisée pendant trois périodes consécutives d'une heure. Après cette opération, conserver les filtres dans de l'eau désionisée. Jeter les premiers 20 ml de filtrat.

26. Au lieu d'une filtration sur membrane, on peut choisir de centrifuger les échantillons. Centrifuger à 40 000 $m.s^{-2}$ (~ 4 000 g) pendant 15 minutes, de préférence dans une centrifugeuse réfrigérée.

Remarque: La différentiation par centrifugation entre le COT et le COD pour de très faibles concentrations semble inopérante, soit parce que toutes les bactéries ne sont pas enlevées, soit parce que du carbone faisant partie du plasma bactérien est redissous. Pour des concentrations d'essai plus élevées (>10 mg/l de C), l'erreur due à la centrifugation semble relativement petite.

Fréquence de prélèvement

27. Si les analyses sont effectuées immédiatement après le prélèvement, déterminer le moment du prélèvement suivant au vu des résultats de la détermination analytique.

28. Si les échantillons sont conservés pour des analyses ultérieures (paragraphe 24) on doit en prélever davantage que cinq. En analysant d'abord les derniers échantillons, puis des échantillons convenablement choisis en revenant par étape «à reculons» vers le début, on peut obtenir une description correcte de la courbe de biodégradation avec un nombre de dosages relativement faible. Si à la fin de l'essai il n'y a eu aucune dégradation, il n'est pas nécessaire d'analyser d'autres échantillons, et dans ce cas, la méthode «à reculons» permet d'économiser une partie considérable des coûts d'analyse.

▼M6

29. Si sur la courbe de dégradation, on observe un plateau avant le 60ème jour, arrêter l'essai. Si la dégradation a démarré de façon certaine au 60ème jour mais n'a pas atteint de plateau, prolonger l'expérience.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

30. Reporter les résultats analytiques sur la feuille de résultats jointe (Appendice 2), et calculer les valeurs de biodégradation pour les substances d'essai et de référence à partir de l'équation:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

avec:

D_t = dégradation en pourcentage de COD ou disparition d'une substance spécifique au temps t,

C_o = concentration initiale de COD ou d'une substance spécifique dans le milieu d'essai,

C_t = concentration de COD ou d'une substance spécifique dans le milieu d'essai au temps t,

$C_{bl(o)}$ = concentration initiale de COD ou d'une substance spécifique dans le témoin,

$C_{bl(t)}$ = concentration de COD ou d'une substance spécifique dans le témoin au temps t.

31. Exprimer la dégradation comme le pourcentage de disparition du COD (dégradation ultime) ou d'une substance spécifique (dégradation primaire) au temps t. Calculer les concentrations en COD à 0,1 mg/l près et arrondir les moyennes des valeurs de D_t à l'entier le plus proche.

32. Tracer sur un diagramme la courbe de dégradation en fonction du temps comme sur la figure du paragraphe «Validité et interprétation des résultats». S'il existe suffisamment de données, à partir de cette courbe calculer la phase de latence (t_L) et le temps nécessaire pour atteindre 50 % d'élimination après la fin de la phase de latence (t_{50}).

Rapport d'essai

33. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Substance d'essai:

— état physique et s'il y a lieu, propriétés physicochimiques;

— données relatives à l'identification.

Conditions d'essai:

— lieu du prélèvement et description du site; état de la pollution et nature des substances nutritives (comptage des colonies, nitrate, ammonium, phosphate, s'il y a lieu);

— caractéristiques de l'échantillon (date et profondeur de prélèvement, aspect, température, salinité, COD (facultatif), délai entre le prélèvement et l'utilisation dans l'essai;

▼**M6**

— méthode utilisée, s'il y a lieu, pour faire vieillir l'eau de mer;

— méthode utilisée pour le prétraitement (filtration/sédimentation) de l'eau de mer;

— méthode utilisée pour la détermination du COD;

— méthode utilisée pour l'analyse spécifique (facultatif);

— méthode utilisée pour déterminer le nombre de bactéries hétérotrophes dans l'eau de mer (méthode de comptage sur boîte ou autre méthode) (facultatif);

— autres méthodes (facultatif) utilisées pour caractériser l'eau de mer (mesures d'ATP, etc.);

Résultats:

— données analytiques reportées sur une feuille de résultats (Appendice 2);

— on trace la courbe de dégradation en fonction du temps sur un diagramme qui indique la phase de latence (t_L), la pente, et le temps nécessaire (à partir de la fin de la période de latence) pour atteindre 50 % d'élimination (t_{50}). La phase de latence peut être évaluée graphiquement comme sur la figure du paragraphe «Critères de validité et interprétation des résultats» ou plus commodément elle peut être déterminée comme le temps nécessaire pour atteindre 10 % de dégradation;

— le pourcentage de dégradation mesuré après 60 jours ou à la fin de l'essai.

Discussion des résultats.

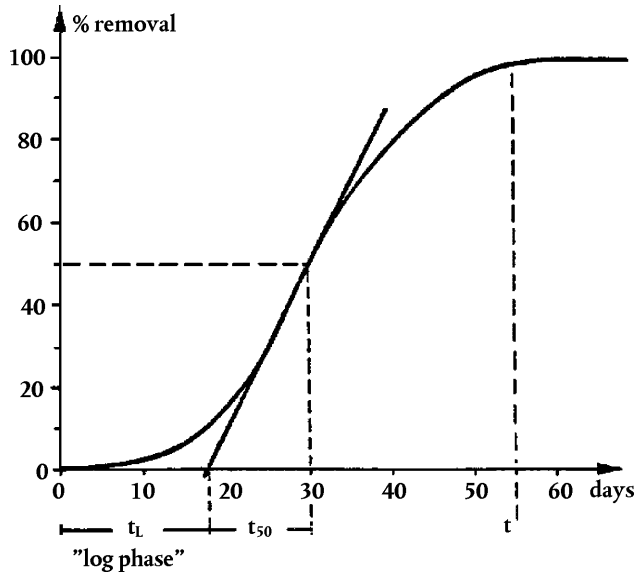
Critères de validité et interprétation des résultats

34. Les résultats obtenus avec les substances de référence par exemple le benzoate de sodium, l'acétate de sodium ou l'aniline, doivent être comparables à ceux de l'essai circulaire (3) (se reporter au paragraphe 7 sur les «Substances de référence»). Si les résultats obtenus avec les substances de référence sont atypiques, l'essai doit être recommencé avec un autre échantillon d'eau de mer. Bien qu'on ne puisse pas toujours interpréter sans ambiguïté les résultats des essais d'inhibition à cause du COD apporté par la substance d'essai, une réduction importante dans le taux de disparition du COD total par rapport à celui du témoin, contrôlant la procédure, constitue une indication de la présence d'effets toxiques.

35. Du fait de l'utilisation de concentrations d'essai relativement élevées par rapport à celles de la plupart des systèmes naturels (et par conséquent d'un rapport défavorable entre les concentrations des substances d'essai et des autres sources de carbone), on doit considérer cette méthode comme un essai préliminaire qui peut être utilisé pour savoir si une substance est facilement biodégradable ou non. C'est pourquoi un résultat faible ne signifie pas nécessairement que la substance d'essai n'est pas biodégradable en milieu marin, mais il indique que davantage de travaux seront nécessaires pour conclure.

Un exemple d'une expérience de dégradation théorique illustrant une façon d'obtenir les valeurs de t_L (durée de la «phase de latence») et de t_{50} (intervalle de temps, démarrant après t_L, nécessaire pour atteindre 50 % de disparition), est donné ci-après

▼M6



MÉTHODE DU FLACON FERMÉ

INTRODUCTION

1. Cette méthode est une variante pour l'eau de mer de l'essai en fiole fermée (5) et elle a été mise au point à la suite d'un essai circulaire organisé pour la Commission européenne (CE) par l'Institut Danois de la Qualité de l'Eau (3).

2. De la même façon que pour la méthode du flacon agité en milieu marin, qui l'accompagne, les résultats de cet essai ne doivent pas être considérés comme des indicateurs de la biodégradabilité facile, mais ils doivent être utilisés de façon spécifique pour obtenir des informations sur la biodégradabilité des substances chimiques en milieu marin.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

3. Une quantité prédéterminée de substance d'essai est dissoute dans le milieu d'essai de façon à obtenir une concentration comprise habituellement entre 2 et 10 mg/l de substance (on peut utiliser une ou plusieurs concentrations). La solution est conservée dans un flacon rempli fermé, dans l'obscurité, au bain-marie ou dans une enceinte thermostatisée entre 15 et 20 °C à ± 1 °C près. Dans les cas, où l'objectif de l'étude est de simuler des situations réelles de l'environnement, les essais peuvent être effectués en dehors de cet intervalle normal de température, pourvu qu'on dispose de moyens appropriés pour contrôler la température. La dégradation est suivie en analysant l'oxygène sur une période de 28 jours.

4. L'essai circulaire a montré que si on prolonge l'essai au-delà de 28 jours, on obtient, dans la plupart des cas, aucune information utile, à cause de graves interférences. Les valeurs du témoin pour la demande biologique en oxygène (DBO) se sont révélées extrêmement élevées, probablement à cause d'une croissance sur les parois due à un manque d'agitation et à cause de la nitrification. La durée d'essai recommandée est donc de 28 jours, mais si la valeur du témoin pour la DBO reste en dessous d'une limite de 30 % (paragraphes 15 et 40) l'essai peut être prolongé.

INFORMATION SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

5. Afin de savoir si on peut appliquer cet essai à une substance particulière, on doit connaître certaines de ses propriétés. Afin de calculer la demande théorique en oxygène (DThO), on doit connaître la formule générale (voir Appendice 3); sinon on doit déterminer la demande chimique en oxygène (DCO) de la substance afin de l'utiliser comme valeur de référence. L'utilisation de la DCO est moins satisfaisante car certaines substances ne sont pas totalement oxydées lors de cet essai.

▼M6

6. La solubilité de la substance doit être supérieure ou égale à 2 mg/l, bien qu'en principe, on puisse tester des substances moins solubles (par exemple en utilisant les ultra-sons) ainsi que des substances volatiles. Il est nécessaire de disposer d'informations sur la pureté ou les proportions relatives des principaux constituants de la substance d'essai afin de pouvoir interpréter les résultats obtenus, en particulier quand ceux-ci se situent près du niveau «seuil».

7. Des informations sur la toxicité de la substance d'essai vis à vis des bactéries [recueillies, par exemple dans des essais à court terme sur le taux de respiration (4)], peuvent s'avérer utiles pour choisir les concentrations d'essai appropriées et elles peuvent être essentielles pour interpréter correctement de faibles valeurs de biodégradation. Cependant, de telles informations ne sont pas toujours suffisantes pour interpréter les résultats obtenus dans l'essai de biodégradation, et la méthode décrite dans le paragraphe 27 est plus adaptée.

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

8. On doit utiliser des substances de référence adéquates pour contrôler l'activité microbienne de l'échantillon d'eau de mer. L'aniline, l'acétate de sodium ou le benzoate de sodium peuvent (par exemple) être utilisés. On doit observer pour ces composés une dégradation d'au moins 60 % (de leur DThO) dans un laps de temps relativement court, sinon il est recommandé de recommencer l'essai en utilisant un autre échantillon d'eau de mer.

9. Dans l'essai circulaire de la CE où les échantillons d'eau de mer étaient prélevés à différents endroits et à différentes périodes de l'année, la phase de latence (t_L) et le temps nécessaire, après la phase de latence, pour atteindre 50 % de dégradation (t_{50}), étaient pour le benzoate de sodium respectivement de 0 à 2 jours et de 1 à 4 jours. Pour l'aniline, les valeurs étaient comprises entre de 0 et 7 jours pour la t_L et entre 2 et 12 jours pour la t_{50}.

REPRODUCTIBILITÉ

10. La reproductibilité de ces méthodes a été établie dans l'essai circulaire de la CE (3).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

11. Matériel courant de laboratoire et:

a) On peut utiliser des flacons pour l'analyse de la DBO d'une contenance de 250 à 300 ml, ou des fioles de 250 ml à col étroit, fermés dans les deux cas par des bouchons de verre;

b) Plusieurs récipients de 2, 3 et 4 litres graduées en litres, pour la préparation de l'expérience et pour le remplissage des flacons à DBO;

c) Un bain-marie ou une pièce thermostatée pour maintenir les récipients à température constante (± 1 °C) et à l'abri de la lumière;

d) Un équipement pour l'analyse de l'oxygène dissous;

e) Des membranes filtrantes d'une porosité de 0,2 à 0,45 μm (facultatif);

f) Un équipement pour des analyses spécifiques (facultatif).

Eau de mer

12. Prélever un échantillon d'eau de mer dans un récipient soigneusement nettoyé et le transporter au laboratoire, de préférence dans un intervalle de un à deux jours après le prélèvement. Au cours du transport, ne pas laisser la température de l'échantillon dépasser de façon importante la température qui sera utilisée dans l'essai.

▼**M6**

13. Identifier précisément l'endroit du prélèvement, décrire son état de pollution et indiquer les substances nutritives qu'on y trouve. En particulier pour les eaux côtières ou les eaux polluées, inclure dans cette caractérisation un comptage des colonies bactériennes hétérotrophes et la détermination des concentrations en nitrate, ammonium et phosphate dissous.

14. Pour l'échantillon d'eau de mer, fournir les informations suivantes:

— date du prélèvement;

— profondeur du prélèvement;

— aspect de l'échantillon — trouble, etc.;

— température au moment du prélèvement;

— salinité;

— carbone organique dissous (COD);

— délai entre le prélèvement et l'utilisation dans l'essai.

15. Si l'on trouve que la teneur en COD de l'échantillon est élevée, ou si l'on pense qu'au bout de 28 jours la DBO du témoin représentera plus de 30 % de celle des substances de référence, il est recommandé de faire vieillir l'échantillon pendant environ une semaine avant son utilisation.

16. Le vieillissement se fait en conservant l'échantillon dans des conditions aérobies à la température de l'essai, dans l'obscurité ou en lumière diffuse. Si nécessaire, les conditions aérobies sont maintenues par une légère agitation. Au cours du vieillissement, la teneur en matière organique facilement dégradable diminue. Dans l'essai circulaire (3), on a trouvé aucune différence entre le potentiel de dégradation d'échantillons d'eau de mer vieillis ou fraîchement recueillis.

17. Avant son utilisation, prétraiter l'eau de mer afin d'en éliminer les grosses particules, par exemple par filtration sur un filtre de nylon ou sur du gros papier filtre (pas de membranes filtrantes ou de filtres GF-C), par sédimentation et décantation. On doit mentionner le procédé utilisé. Si l'échantillon est vieilli, effectuer le prétraitement après vieillissement.

Solutions mères des substances nutritives minérales

18. Préparer les solutions-mères suivantes en utilisant des réactifs de qualité pour analyse:

a) Dihydrogénophosphate monopotassique, KH_2PO_4 8,50 g

Hydrogénophosphate dipotassique, K_2HPO_4 21,75 g

Hydrogénophosphate disodique dihydraté, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 33,30 g

Chlorure d'ammonium, NH_4Cl 0,50 g

Dissoudre et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.

b) Chlorure de calcium anhydre, $CaCl_2$ 27,50 g

Dissoudre et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.

c) Sulfate de magnésium heptahydraté, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 22,50 g

Dissoudre et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.

d) Chlorure de fer (III) hexahydraté, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,25 g

Dissoudre et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.

▼M6

On peut éviter la précipitation de la solution (d) en ajoutant une goutte d'HCl concentré ou 0,4 g d'acide éthylènediamine-tétraacétique (sel disodique de l'EDTA). S'il se forme un précipité dans une solution-mère, la remplacer par une solution fraîchement préparée.

Préparation du milieu d'essai

19. Ajouter 1 ml de chacune des solutions mères ci-dessus par litre d'eau de mer prétraitée. Saturer le milieu avec de l'air à la température de l'essai, en y faisant barboter de l'air comprimé propre pendant environ 20 minutes. Déterminer la concentration en oxygène dissous à des fins de contrôle. On peut lire sur l'abaque inclus dans cette méthode d'essai (Appendice 4) la concentration de saturation en oxygène dissous en fonction de la salinité et de la température.

Inoculum

20. Ne pas ajouter d'inoculum spécifique, en plus des micro-organismes déjà présents dans l'eau de mer. Déterminer (facultativement) le nombre d'hétérotrophes formant colonies présents dans le milieu d'essai contenant l'eau de mer (et de préférence également dans les échantillons d'eau de mer du départ) par exemple par comptage sur boîte, en utilisant de l'agar marin. Ceci est particulièrement souhaitable pour les échantillons provenant de zones côtières ou polluées. Contrôler l'activité microbienne hétérotrophe dans l'eau de mer en effectuant un essai avec une substance de référence.

Préparation des flacons

21. Toutes les manipulations nécessaires y compris le vieillissement et le prétraitement de l'eau de mer sont réalisées à la température d'essai choisie, comprise entre 15 et 20 °C; toute la verrerie doit être propre mais non stérile.

22. Pour la détermination de la DBO des substances d'essai et de référence préparer des groupes de flacons à DBO dans des séries expérimentales simultanées. Réaliser toutes les analyses dans des récipients en double (témoins, substances de référence et d'essai), c'est-à-dire préparer deux récipients pour chaque détermination. Effectuer au moins quatre analyses aux jours 0, 5, 15 et 28. Pour les analyses d'oxygène, quatre déterminations exigent un total de $3 \times 2 \times 4 = 24$ flacons (témoin, substance d'essai et de référence) et ainsi environ 8 litres de milieu d'essai (pour une seule concentration de la substance d'essai).

23. Préparer les solutions séparées des substances d'essai et de référence dans de grands récipients d'un volume suffisant (paragraphe 11) en ajoutant d'abord les substances d'essai et de référence soit directement, soit à partir d'une solution mère concentrée, dans les récipients partiellement remplis. Ajouter du milieu d'essai supplémentaire jusqu'à obtenir les concentrations finales désirées. Si on utilise des solutions mères de substances d'essai et/ou de référence, s'assurer que la salinité du milieu contenant l'eau de mer n'a pas été modifiée de façon importante.

24. Choisir les concentrations des substances d'essai et de référence en tenant compte de:

a) la solubilité de l'oxygène dissous dans l'eau de mer pour la température et la salinité choisies pour l'essai (voir l'abaque ci-jointe de l'Appendice 4);

b) la valeur de la DBO de l'eau de mer dans le témoin; et

c) la valeur attendue pour la biodégradabilité de la substance d'essai.

▼M6

25. Pour une salinité de 32 pour mille (eau de l'océan), la solubilité de l'oxygène dissous est d'environ 8,1 mg/l à 15 °C et 7,4 mg/l à 20 °C. La consommation en oxygène de l'eau de mer elle-même. (respiration témoin) peut aller jusqu'à 2 mg O_2/l ou plus, si l'eau de mer n'a pas été vieillie. C'est pourquoi, pour être sûr qu'après l'oxydation de la substance d'essai, il reste une concentration significative en oxygène, on utilise au départ une concentration d'environ 2 à 3 mg/l (selon la DThO) pour les substances qui sont susceptibles d'être complètement dégradées dans les conditions de l'essai (comme les substances de référence). Les substances moins dégradables sont testées à des concentrations supérieures, jusqu'à environ 10 mg/l, dans la mesure où cela n'entraîne pas d'effets toxiques. Il peut s'avérer intéressant d'effectuer en parallèle des essais avec une concentration faible (environ 2 mg/l) et une concentration élevée (environ 10 mg/l) de la substance d'essai.

26. On doit déterminer en parallèle les valeurs témoins pour l'oxygène, dans des récipients qui ne contiennent ni substance d'essai ni substance de référence.

27. Si l'on veut évaluer des effets inhibiteurs, préparer dans différents grands récipients, les séries de solutions suivantes (paragraphe 13):

a) 2 mg/l d'une substance facilement dégradable, par exemple une des substances de référence proposées;

b) x mg/l de substance d'essai (x est habituellement égal à 2);

c) 2 mg/l de la substance facilement dégradable plus x mg/l de substance d'essai.

Témoin physicochimique (facultatif)

28. Si on choisit de faire des analyses spécifiques, on peut effectuer une expérience physico-chimique afin de vérifier si la substance d'essai est éliminée par des mécanismes abiotiques tels qu'une hydrolyse ou une adsorption. Un témoin physico-chimique peut être réalisé en ajoutant du chlorure de mercure (II) ($HgCl_2$) ([1]) (à raison de 50 à 100 mg/l) dans des récipients en double contenant la substance d'essai, afin de stopper l'activité microbienne. Une diminution importante de la concentration d'une substance spécifique au cours de l'essai indique l'existence de mécanismes d'élimination abiotiques.

Nombre de flacons à DBO dans un essai type

29. Dans un essai type on utilise les flacons suivants:

— au moins 8 flacons contenant la substance d'essai;

— au moins 8 flacons contenant uniquement l'eau de mer fortifiée par des substances nutritives;

— au moins 8 flacons contenant la substance de référence, et si nécessaire

— 6 flacons contenant les substances d'essai et de référence (témoin de toxicité).

EXÉCUTION DE LA MÉTHODE

30. Après préparation, siphonner immédiatement chaque solution à partir du quart inférieur (pas à partir du fond) du grand récipient approprié afin de remplir les séries respectives de flacons à DBO. Mesurer immédiatement l'oxygène dissous à l'instant zéro (paragraphe 33) ou conserver par précipitation avec $MnCl_2$ [chlorure de manganèse (II)] et NaOH (hydroxyde de sodium) les témoins du temps zéro en vue d'une analyse chimique ultérieure.

([1]) Le chlorure de mercure (II) ($HgCl_2$) est une substance très toxique qui doit être manipulée avec certaines précautions. Les déchets aqueux contenant ce produit chimique doivent être éliminés de façon appropriée; ils ne doivent pas être directement jetés à l'égout.

▼M6

31. Les flacons à DBO restants menés en parallèle sont incubés à la température de l'essai (15 à 20 °C), dans l'obscurité et retirés de la zone d'incubation à intervalles réguliers (par exemple au minimum après 5, 15 et 28 jours) et on mesure leur concentration en oxygène dissous (paragraphe 33).

32. Les échantillons destinés à des analyses spécifiques (facultatives) sont filtrés sur membrane (0,2 à 0,45 μm) ou centrifugés pendant 15 minutes. Si on ne les analyse pas immédiatement, les conserver entre 2 et 4 °C pendant au maximum 48 heures ou à – 18 °C sur de plus longues périodes (si l'on sait que cela n'affectera pas la substance d'essai, acidifier à pH 2 avant stockage).

Détermination de l'oxygène dissous

33. Déterminer la concentration en oxygène dissous en utilisant une méthode chimique ou électrochimique reconnue au niveau national ou international.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

34. Reporter les résultats analytiques sur les feuilles de résultats jointes (Appendice 5).

35. Calculer la DBO en faisant la différence entre la perte en oxygène d'une solution témoin et d'une solution contenant la substance d'essai dans les conditions de l'essai. Diviser cette perte nette en oxygène par la concentration de la substance (en poids/volume) afin d'exprimer la DBO en mg de DBO/mg de substance. La dégradation est calculée en divisant la demande biochimique en oxygène soit, de préférence, par la demande théorique en oxygène (DThO) soit par la demande chimique en oxygène (DCO) et elle est exprimée sous forme de pourcentage (voir le paragraphe 36).

36. Pour chaque temps de prélèvement, calculer les valeurs de la biodégradation à la fois pour les substances d'essai et de référence en utilisant l'une ou l'autre des équations suivantes:

$$\%\ biodégradation = \frac{mg\ O_2/mgsubstance\ testée}{mg\ DThO/mgsubstance\ testée} \times 100$$

$$\%\ biodégradation = \frac{mg\ O_2/mgsubstance\ testée}{mg\ DCO/mgsubstance\ testée} \times 100$$

avec:

DThO = demande théorique en oxygène (calculs en Appendice 3)

DCO = demande chimique en oxygène, déterminée expérimentalement.

Remarque: Il arrive que les deux modes de calcul (pourcentage de la DThO ou pourcentage de la DCO) ne donnent pas les mêmes résultats; il est préférable d'utiliser la DThO, car dans l'essai de la DCO certaines substances ne sont pas complètement oxydées.

37. Tracer sur un diagramme la courbe de dégradation en fonction du temps (voir l'exemple du paragraphe «Validité et interprétation des résultats»). S'il existe suffisamment de données, à partir de cette courbe calculer la phase de latence (t_L) et le temps nécessaire pour atteindre 50 % d'élimination après la fin de la phase de latence (t_{50})

38. Si on réalise une analyse spécifique (facultatif), le pourcentage de dégradation primaire correspond au pourcentage de disparition de la substance spécifique au cours de la période d'essai (corrigé de la valeur obtenue dans les témoins).

▼M6

Rapport d'essai

39. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Substance d'essai:

— état physique et s'il y a lieu, propriétés physicochimiques;

— données relatives à l'identification.

Conditions d'essai:

— lieu du prélèvement et description du site: état de la pollution et nature des substances nutritives (comptage des colonies, nitrate, ammonium, phosphate, s'il y a lieu);

— caractéristiques de l'échantillon [date et profondeur de prélèvement, aspect, température, salinité, COD (facultatif), délai entre le prélèvement et l'utilisation dans l'essai];

— méthode utilisée, s'il y a lieu, pour faire vieillir l'eau de mer;

— méthode utilisée pour le prétraitement (filtration/sédimentation) de l'eau de mer;

— méthode utilisée pour la détermination de la DCO (si elle est effectuée);

— méthode utilisée pour mesurer l'oxygène;

— procédé de dispersion des substances peu solubles dans les conditions de l'essai;

— méthode utilisée pour déterminer le nombre de bactéries hétérotrophes dans l'eau de mer (méthode de comptage sur boîte ou autre méthode);

— méthode utilisée pour déterminer le COD dans l'eau de mer (facultatif);

— méthode utilisée pour l'analyse spécifique (facultatif);

— autres méthodes facultatives utilisées pour caractériser l'eau de mer (mesures d'ATP, etc.);

Résultats

— données analytiques reportées sur une feuille de résultats (comme celle jointe en Appendice 5);

— la courbe de dégradation en fonction du temps représentée sur un diagramme qui indique la phase de latence (t_L), la pente, et le temps nécessaire (à partir de la fin de la période de latence) pour atteindre 50 % de la consommation finale en oxygène due à l'oxydation de la substance d'essai (t_{50}). La phase de latence peut être évaluée graphiquement comme sur la figure jointe, ou plus commodément déterminée comme le temps nécessaire pour atteindre 10 % de dégradation;

— le pourcentage de dégradation mesuré après 28 jours.

Discussion des résultats.

Critères de validité et interprétation des résultats

40. La respiration du témoin ne doit pas dépasser 30 % de l'oxygène consommé dans le récipient d'essai. S'il n'est pas possible de se conformer à ce critère en utilisant de l'eau de mer fraîchement prélevée, celle-ci doit être vieillie (stabilisée) avant utilisation

41. On doit tenir compte du fait que les substances azotées peuvent modifier les résultats.

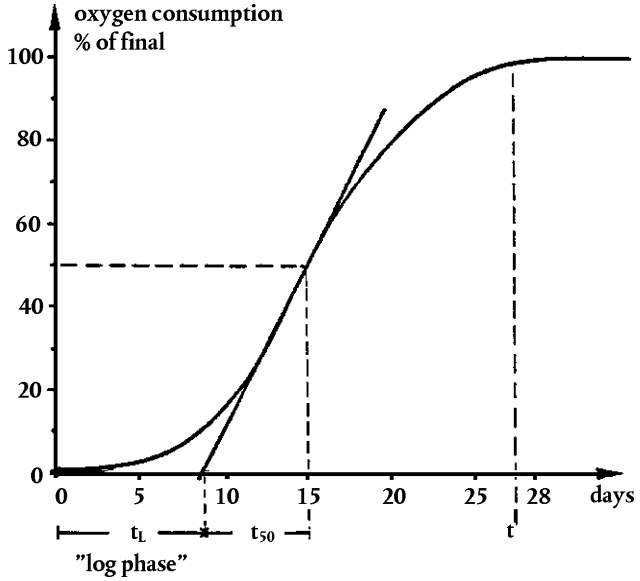
▼M6

42. Les résultats obtenus avec les substances de référence, par exemple le benzoate de sodium et l'aniline, doivent être comparables à ceux de l'essai circulaire (3) (paragraphe 9). Si les résultats obtenus avec les substances de référence sont atypiques, l'essai doit être recommencé avec un autre échantillon d'eau de mer.

43. On peut considérer que la substance d'essai inhibe les bactéries (à la concentration utilisée) si la DBO du mélange des substances d'essai et de référence est inférieure à la somme des DBO des solutions séparées des deux substances.

44. Du fait de l'utilisation de concentrations d'essai relativement élevées par rapport à celles de la plupart des systèmes naturels et par conséquent d'un rapport défavorable entre les concentrations de la substance d'essai et des autres sources de carbone, on doit considérer cette méthode comme un essai préliminaire qui peut être utilisé pour savoir si une substance est facilement biodégradable ou non. C'est pourquoi un résultat faible ne signifie pas nécessairement que la substance d'essai n'est pas biodégradable en milieu marin, mais il indique que davantage de travaux seront nécessaires pour conclure.

Un exemple d'une expérience de dégradation théorique illustrant une façon d'évaluer les valeurs de t_L (durée de la «phase de latence») et de t_{50}, intervalle de temps (démarrant après t_L), nécessaire pour atteindre 50 % de la consommation finale en oxygène due à l'oxydation de la substance d'essai, est donné ci-après.



BIBLIOGRAPHIE

(1) de Kreuk J.F. and Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of organic fraction of chemical wastes. Chemosphere 10 (6); 561-573.

(2) Chapitre C.4-B de la présente annexe: Détermination de la biodégradabilité «facile», Partie III: Essai de screening modifié de l'OCDE.

(3) N. Nyholm & P. Kristensen. Screening test methods for assessment of biodegradability of chemical substances in seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, mars 1987, Commission des Communautés européennes (1985).

(4) Chapitre C.11 de la présente annexe: Biodégradation — Boues activées: essai d'inhibition de la respiration.

(5) Chapitre C.4-E de la présente annexe: Détermination de la biodégradabilité «facile», Partie VI — Essai en fioles fermées.

▼**M6**

Appendice 1

Détermination du carbone organique dans l'eau de mer

MÉTHODE DU FLACON AGITÉ

Pour déterminer le carbone organique d'un échantillon aqueux on oxyde les composés organiques de cet échantillon en dioxyde de carbone en utilisant généralement l'une des trois techniques suivantes:

— oxydation-voie humide par persulfate/irradiation-UV;

— oxydation-voie humide par persulfate/température élevée (116-130 °C);

— combustion.

La quantité de CO_2 dégagée est mesurée par spectrométrie infrarouge ou par titrimétrie, ou bien le CO_2 est réduit en méthane qui est dosé par un détecteur à ionisation de flamme (DIF).

La méthode persulfate/UV est communément utilisée pour analyser de l'eau «propre» avec une faible teneur en matière particulaire. Les deux autres méthodes peuvent être appliquées à la plupart des types d'échantillons d'eau, l'oxydation par le persulfate à température élevée se révélant plus adaptée pour les échantillons de faible teneur en carbone organique, tandis que la technique de la combustion s'applique aux échantillons dont la teneur en carbone organique non volatil (CONV) se situe bien au dessus de 1 mg/l de C.

Interférences

Ces trois méthodes dépendent de l'élimination ou de la compensation du carbone inorganique (CI) présent dans l'échantillon. Afin d'éliminer le CI, la méthode la plus fréquemment utilisée consiste à purger l'échantillon acidifié de son CO_2, bien que cette manipulation entraîne également une perte des composés organiques volatils (1). L'élimination complète ou la compensation du CI doit être effectuée pour chaque type d'échantillon, et, selon les échantillons, le carbone organique volatil doit être déterminé, en plus du CONV.

Des concentrations élevées en chlorure entraînent une diminution de l'efficacité de l'oxydation quand on emploie la méthode persulfate/UV (2). Cette interférence peut cependant être éliminée en utilisant un oxydant modifié par l'addition de nitrate de mercure (II). Lors de l'étude d'échantillons contenant des chlorures, il est recommandé d'utiliser un volume d'échantillon le plus grand possible. Avec la méthode par combustion, des concentrations élevées en sel dans les échantillons analysés peuvent entraîner un dépôt de sel sur le catalyseur et une corrosion excessive du tube de combustion. On doit prendre les précautions indiquées dans le manuel du fabricant.

Quand on utilise la méthode persulfate/UV, il peut arriver que les échantillons très troubles ainsi que ceux qui contiennent des particules soient incomplètement oxydés.

Exemple d'une méthode appropriée

Le carbone organique non volatil est déterminé par oxydation au moyen de persulfate/irradiation UV et le CO_2 qui se dégage alors est dosé par spectrométrie infrarouge non dispersive.

Le réactif pour l'oxydation est modifié selon les suggestions données dans (2) et comme décrit dans le manuel du fabricant:

a) 8,2 g de $HgCl_2$ et 9,6 g de $Hg(NO_3)_2$ H_2O sont dissous dans quelques centaines de millilitres d'eau de dilution contenant une faible concentration en carbone;

b) 20 g de $K_2S_2O_8$ sont dissous dans la solution de sel mercurique;

▼**M6**

c) 5 ml de HNO_3 (concentré) sont ajoutés au mélange;

d) le réactif est dilué jusqu'à un volume final de 1 000 ml.

On supprime l'interférence due au chlorure en utilisant un volume d'échantillon de 40 µl pour 10 % de chlorure et un volume d'échantillon de 200 µl pour 1,9 % de chlorure. Avec cette méthode on peut analyser des échantillons de forte teneur en chlorure et/ou des volumes d'échantillon plus importants dans la mesure où on empêche le chlorure de se former dans le récipient d'oxydation. On peut ensuite, si nécessaire, déterminer le carbone organique volatil dans le type d'échantillon étudié.

BIBLIOGRAPHIE

(1) ISO, Qualité de l'eau — détermination du carbone organique total. Projet de norme internationale ISO/DIS 8245, 16 janvier 1986.

(2) American Public Health Association, Standard methods for the estimation of water and wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16ème édition (1985).

Également intéressant (donne une description d'un système d'autoanalyse):

(3) W. Schreurs (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. Hydrobiological Bulletin 12, 137-142.

▼**M6**

Appendice 2

Biodégradation dans l'eau de mer

MÉTHODE DU FLACON AGITÉ

FEUILLE DE RÉSULTATS

1. **LABORATOIRE:**

2. **DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI:**

3. **SUBSTANCE D'ESSAI:**

Nom:

Concentration de la solution mère: mg/l de substance

Concentration initiale dans le milieu, t_0: mg/l de substance

mg COD/l

4. **EAU DE MER:**

Origine:

Date du prélèvement:

Profondeur du prélèvement:

Aspect au moment du prélèvement (par exemple trouble, etc.):

Salinité au moment du prélèvement: ‰

Température au moment du prélèvement: °C

COD «x» heures après le prélèvement: mg /l

Prétraitement avant l'essai (par exemple filtration, sédimentation, vieillissement, etc.):

Comptage des colonies microbiennes: — échantillon de départ: colonies/ml

— au début de l'essai: colonies/ml

Autres caractéristiques:

5. **DOSAGES DU CARBONE:**

Analyseur de carbone:

	Flacon n°		COD après n jours (mg/ml)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Essai: eau de mer fortifiée par des substances nutritives contenant la substance d'essai	1	a_1					
		a_2					
		moyenne, $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		moyenne, $C_{b(t)}$					

▼**M6**

	Flacon n°		COD après n jours (mg/ml)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Témoin: eau de mer fortifiée par des substances nutritives ne contenant pas la substance d'essai	1	c_1					
		c_2					
		moyenne, $C_{c(t)}$					
	2	d_1					
		d_2					
		moyenne, $C_{d(t)}$					
	Moyenne, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **ÉVALUATION DES DONNÉES BRUTES:**

Flacon n°	Calcul des résultats	% de dégradation après n jours				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
2	$D_2 = 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
Moyenne (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) On ne doit pas faire la moyenne de D_1 et D_2 s'il existe une grande différence entre ces deux valeurs.

Remarque: des tableaux similaires peuvent être utilisés quand on suit la dégradation par une analyse spécifique et également pour la substance de référence et les témoins de toxicité.

7. **DÉGRADATION ABIOTIQUE (facultatif)**

	Temps (en jours)	
	0	t
Concentration en COD (en mg/l) dans le témoin stérile	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ dégradation abiotique} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

▼M6

Appendice 3

Calcul de la demande théorique biochimique en oxygène

MÉTHODE DU FLACON FERMÉ

La DThO de la substance $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ de poids moléculaire PM est calculée d'après la formule:

$$DThO_{NH3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

Ce calcul implique que C est minéralisé en CO_2 et que H est transformé en H_2O, P en P_2O_5 et Na en Na_2O. Les halogènes sont éliminés sous forme d'halogénures d'hydrogène et l'azote sous forme d'ammoniac.

Exemple:

le glucose $C_6H_{12}O_6$, de PM = 180

$$DThO = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07\ mg\ O_2/mg\ glucose$$

Les poids moléculaires des sels autres que ceux des métaux alcalins sont calculés en supposant qu'ils ont été hydrolysés.

On considère que le soufre est oxydé à l'état + 6.

Exemple:

le n-dodécylbenzènesulfonate de sodium $C_{18}H_{29}SO_3Na$, de PM = 348

$$DThO = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34\ mg\ O_2/mg\ substance$$

Dans le cas des substances azotées, l'azote peut être éliminé sous forme d'ammoniac, de nitrite ou de nitrate correspondant à différentes demandes théoriques en oxygène.

$$DThO_{NO2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2_p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{PM}$$

$$DThO_{NO3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{PM}$$

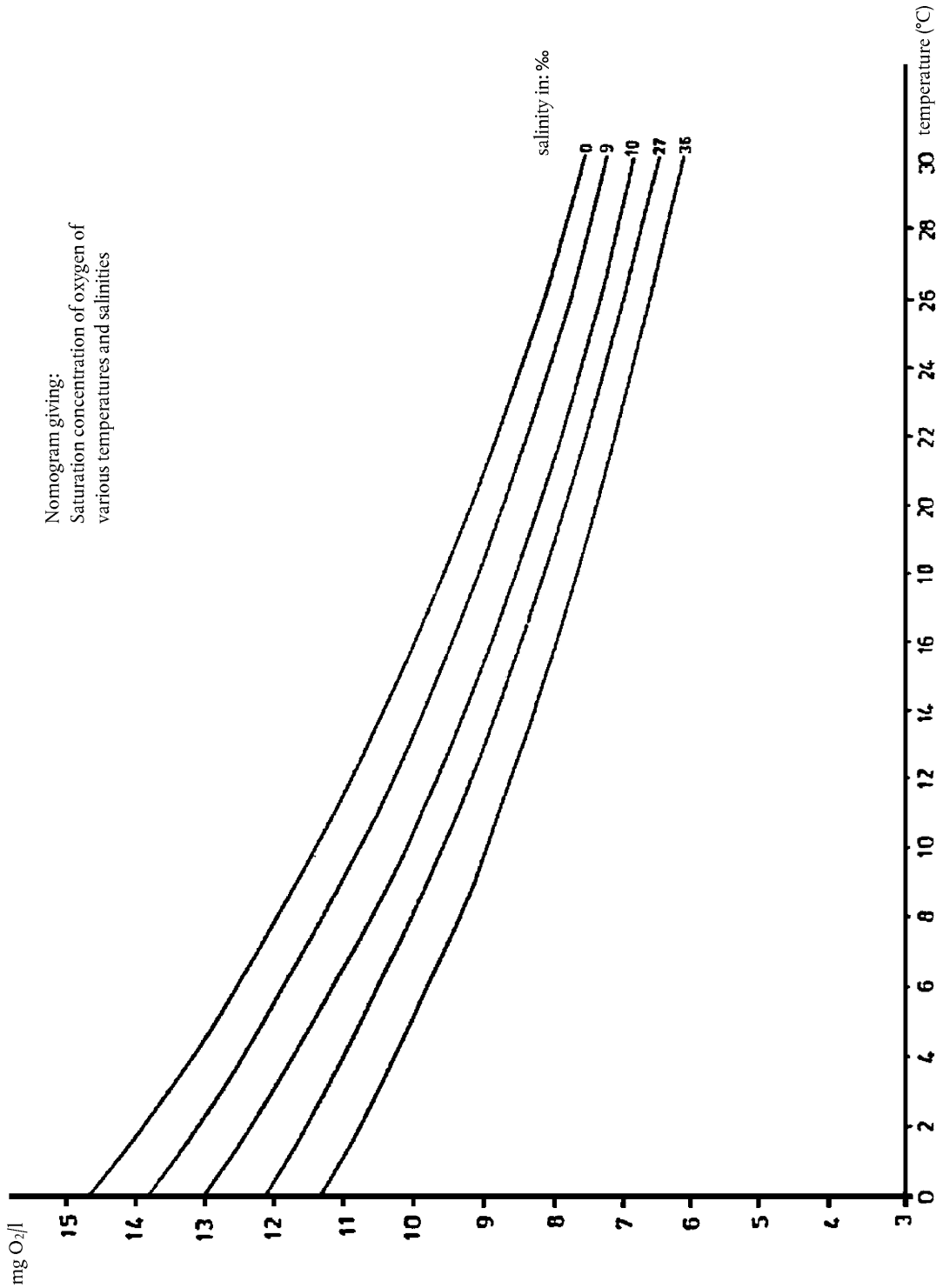
Par exemple, si dans le cas d'une amine secondaire, l'analyse a montré que l'azote était entièrement sous forme de nitrate:

$(C_{12}H_{25})_2NH$, de PM = 353

$$DThO_{NO3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44\ mg\ O_2/mg\ substance$$

▼**M6**

Appendice 4



▼M6

Appendice 5

Biodégradation dans l'eau de mer

MÉTHODE DU FLACON FERMÉ

FEUILLE DE RÉSULTATS

1. **LABORATOIRE:**

2. **DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI:**

3. **SUBSTANCE D'ESSAI:**

Nom:

Concentration de la solution mère:	mg /l
Concentration initiale dans le milieu contenant l'eau de mer:	mg /l
DThO ou DCO:	mg O_2/mg de substance testée

4. **EAU DE MER:**

Origine:

Date du prélèvement:

Profondeur du prélèvement:

Aspect au moment du prélèvement (par exemple trouble, etc.):

Salinité au moment du prélèvement:	‰
Température au moment du prélèvement:	°C
COD «x» heures après le prélèvement:	mg /l

Prétraitement avant l'essai (par exemple filtration, sédimentation, vieillissement, etc.):

Comptage des colonies microbiennes:	— échantillon de départ:	colonies/ml
	— au début de l'essai:	colonies/ml

Autres caractéristiques:

5. **MILIEU D'ESSAI:**

Température après aération:	°C
Concentration en O_2 après aération et avant le début de l'essai:	mg O_2/l

6. **DOSAGE DE L'OXYGÈNE DISSOUS:**

Méthode: Winkler/électrode

	Flacon n°		mg O_2/l après n jours			
			0	5	15	28
Essai: eau de mer, fortifiée par des substances nutritives, contenant la substance d'essai	1	a_1				
	2	a_2				
	Moyenne essai	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

▼**M6**

	Flacon n°		mg O_2/l après n jours			
			0	5	15	28
Témoin: eau de mer, fortifiée par des substances nutritives, ne contenant pas la substance d'essai	1	c_1				
	2	c_2				
	Moyenne essai	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Remarque: Des tableaux similaires peuvent être utilisés pour la substance de référence et pour les témoins de toxicité.

7. **DIMINUTION DE L'OXYGÈNE DISSOUS: % DE DÉGRADATION (% D):**

	Diminution de l'oxygène dissous après n jours		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ (1)			
$\%D = \frac{(m_b - m_t)(1)}{substance\ \ d'essai(mg/l) \times DThO} \times 100$			

(1) Ceci suppose que $m_{b(o)} = m_{t(o)}$, avec
$m_{b(o)}$ = valeur du témoin au jour 0,
$m_{t(o)}$ = valeur de la substance d'essai au jour 0.
Si $m_{b(o)}$ n'est pas égal à $m_{t(o)}$, utiliser $(m_{t(o)} - m_{t(x)}) - (m_{b(o)} - m_{b(x)})$, avec
$m_{b(x)}$ = valeur du témoin au jour x,
$m_{t(x)}$ = valeur de la substance d'essai au jour x.

▼M6

C.43. ESSAI DE BIODÉGRADABILITÉ ANAÉROBIE DES SUBSTANCES ORGANIQUES DANS UNE BOUE DIGÉRÉE: MESURE DU DÉGAGEMENT GAZEUX

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 311 (2006) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Il existe plusieurs essais de dépistage permettant de classer les substances organiques en fonction de leur biodégradabilité aérobie [méthodes d'essai C.4, C.9, C.10 et C.11 (1) et ligne directrice 302 C de l'OCDE (2)] et les résultats de ces essais ont permis de prédire de manière très satisfaisante le devenir de substances chimiques en milieu aérobie, en particulier aux stades aérobies du traitement des eaux usées. Des proportions diverses de substances insolubles dans l'eau et de substances s'adsorbant sur les particules solides des eaux usées sont également soumises à un traitement aérobie, puisqu'elles sont présentes dans les eaux usées décantées. Néanmoins, la majeure partie de ces substances est associée aux boues de décantation primaire, qui sont séparées des eaux usées non traitées dans des cuves de décantation avant que la partie surnageante des eaux usées subisse un traitement aérobie. La boue, qui renferme une partie des substances solubles dans le liquide interstitiel, est ensuite déversée dans un digesteur chauffé où elle subit un traitement anaérobie. À ce jour, il n'existe aucun essai dans cette série destiné à évaluer la biodégradabilité anaérobie dans les digesteurs anaérobies, d'où cette proposition de nouvelle Ligne directrice. Cet essai n'est pas nécessairement applicable à d'autres milieux anoxiques de l'environnement.

2. Des techniques respirométriques permettant de mesurer les quantités de gaz produites en anaérobiose, essentiellement du méthane (CH_4) et du dioxyde de carbone (CO_2), ont été utilisées avec succès pour évaluer la biodégradabilité anaérobie. Birch et al. (3) ont passé ces procédés en revue et conclu que les travaux de Shelton et Tiedje (4), fondés sur des études antérieures (5)(6)(7), étaient les plus complets. Cette méthode (4), qui a été mise au point par d'autres (8) et est devenue des normes américaines (9)(10), ne résout pas les problèmes liés à la différence de solubilité entre le CO_2 et le CH_4 dans le milieu expérimental et au calcul de la production gazeuse théorique d'une substance d'essai. En recommandant de mesurer également la teneur en carbone inorganique dissous du liquide surnageant, le rapport de l'ECETOC (3) a étendu le champ d'application de la technique. La méthode de l'ECETOC, qui a fait l'objet d'un étalonnage international (ou essai circulaire), est devenue la norme ISO 11734 (11).

3. La présente méthode d'essai, basée sur la norme ISO 11734 (11), décrit une méthode d'essai préliminaire destinée à évaluer la biodégradabilité anaérobie potentielle des substances organiques dans des conditions spécifiques (dans un digesteur anaérobie, sur une période définie et avec une gamme de concentrations de micro-organismes déterminée). Étant donné qu'on utilise une boue diluée et une concentration relativement élevée de substance d'essai et que la durée de l'essai est supérieure au temps de rétention appliqué dans les digesteurs anaérobies, les conditions de cet essai ne correspondent pas nécessairement aux conditions régnant dans les digesteurs anaérobies et ne s'appliquent pas forcément à l'évaluation de la biodégradabilité anaérobie de substances organiques dans d'autres conditions environnementales. La boue est exposée à la substance d'essai durant une période allant jusqu'à 60 jours, donc supérieure au temps de rétention normal des boues (25 à 30 jours) dans les digesteurs anaérobies, bien que ce temps de rétention puisse être bien plus long sur des sites industriels. Les résultats de cet essai ne permettent pas de formuler des prédictions aussi convaincantes que pour les essais de biodégradation aérobie. En effet, grâce aux essais de biodégradabilité aérobie facile et aux essais de simulation ainsi qu'en aérobiose, on a accumulé suffisamment de données sur le comportement des substances d'essai pour démontrer qu'il existe une connexion. Tandis que les données dont on dispose en ce qui concerne les milieux anaérobies sont beaucoup plus fragmentaires. On peut supposer que la biodégradation est complète si on atteint 75 à 80 % de la production gazeuse théorique. Les quotients élevés de

▼M6

quantité de substance chimique par biomasse appliqués dans cet essai impliquent que si une substance s'avère biodégradable à l'issue de cet essai, elle a encore plus de chances d'être dégradée dans un digesteur anaérobie. De plus, une substance qui ne se transforme pas en gaz au cours de cet essai ne sera pas nécessairement persistante dans des conditions où le quotient quantité de substance par biomasse est plus proche de celui qui règne dans la nature. Interviennent également d'autres réactions anaérobies susceptibles de dégrader, au moins partiellement, les substances, par exemple la déchloration, mais cet essai ne détecte pas ces réactions. Toutefois, certaines méthodes analytiques spécifiques permettent de suivre la disparition de la substance d'essai (voir les paragraphes 6, 30, 44 et 53).

PRINCIPE DE L'ESSAI

4. Une boue digérée et lavée ([1]), à faible concentration (< 10 mg/l) de carbone inorganique (CI), est diluée environ dix fois, de telle sorte que la concentration des solides totaux atteigne 1 à 3 g/l, et est incubée à 35 °C ± 2 °C dans des récipients hermétiquement fermés, en présence de la substance d'essai à raison de 20 à 100 mg de C/l, durant une période allant jusqu'à 60 jours. L'activité de la boue est mesurée dans des récipients témoins à blanc contenant l'inoculum boueux mais pas la substance d'essai et incubés parallèlement aux récipients expérimentaux.

5. L'augmentation de la pression dans l'espace libre (situé au dessus du liquide dans les récipients) provoquée par la production de dioxyde de carbone et de méthane est mesurée. Dans les conditions de l'essai, une proportion appréciable du CO_2 produit est dissoute dans la phase liquide ou transformée en carbonate ou en carbonate d'hydrogène. Ce carbone inorganique est mesuré à la fin de l'essai.

6. La quantité de carbone (inorganique et méthane) dégagée par la biodégradation de la substance d'essai est calculée d'après la production nette de gaz et la formation nette de carbone inorganique dans la phase liquide excédant celles relevées dans les récipients témoins. L'ampleur de la biodégradation est calculée d'après la production de carbone inorganique total et de carbone méthanique et exprimée en pourcentage de la quantité mesurée ou calculée de carbone ajouté par la substance d'essai. Le déroulement de la biodégradation peut être suivi par des mesures intermédiaires de la seule production gazeuse. De plus, la biodégradation primaire peut être déterminée par des analyses spécifiques au début et à la fin de l'essai.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

7. Afin de pouvoir interpréter correctement les résultats, il est nécessaire de connaître la pureté, la solubilité dans l'eau, la volatilité et les caractéristiques d'adsorption de la substance d'essai. La teneur en carbone organique de la substance d'essai (% poids/poids) doit être établie d'après sa structure chimique ou par une mesure. Pour des substances d'essai volatiles, il est utile de disposer d'une constante de Henry mesurée ou calculée pour savoir si cet essai est applicable à ces substances. Les informations sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des bactéries anaérobies permettent de sélectionner une concentration expérimentale appropriée et facilitent l'interprétation des résultats lorsque la biodégradabilité est faible. Il est recommandé d'inclure un témoin destiné à vérifier le pouvoir d'inhibition de la substance, sauf s'il est établi que la substance d'essai n'inhibe pas l'activité des micro-organismes anaérobies (voir le paragraphe 21 et la norme ISO 13641-1 (12)).

([1]) La boue digérée est un mélange des phases décantées des eaux usées et de boue activée, qui a été mis à incuber dans un digesteur anaérobie à environ 35 °C afin de réduire sa biomasse et les problèmes d'odeur et d'améliorer l'aptitude de la boue au séchage. Elle consiste en une association de bactéries méthanogènes et fermentaires anaérobies produisant du dioxyde de carbone et du méthane (11).

▼**M6**

CHAMP D'APPLICATION DU PROCÉDÉ EXPÉRIMENTAL

8. La présente méthode d'essai s'applique à des substances solubles dans l'eau, et peut aussi être réalisée sur des substances peu solubles ou insolubles, à condition d'utiliser une méthode de dosage exacte [voir, par exemple, ISO 10634 (13)]. Il faut généralement prendre une décision au cas par cas pour les substances volatiles. Des précautions particulières s'imposent, par exemple empêcher tout dégagement gazeux durant l'essai.

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

9. Pour vérifier le mode opératoire, on teste une substance de référence parallèlement à la substance d'essai dans des récipients appropriés. Le phénol, le benzoate de sodium et le polyéthylèneglycol 400 sont des exemples de substances de référence dont la dégradation devrait dépasser 60 % de la production gazeuse théorique (c'est-à-dire méthane et carbone inorganique) en l'espace de 60 jours (3)(14).

REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS

10. Dans un essai tournant international (14), une bonne reproductibilité a été relevée entre les mesures de la production gazeuse effectuées dans des récipients représentés en trois exemplaires. L'écart-type relatif (coefficient de variation) était presque toujours inférieur à 20 %, bien qu'il dépassait souvent les 20 % en présence de substances toxiques ou vers la fin de la période d'incubation de 60 jours. Des écarts plus importants ont également été observés dans des récipients ayant un volume inférieur à 150 ml. Les valeurs finales du pH dans le milieu d'essai étaient comprises entre 6,5 et 7,0.

11. Les résultats suivants ont été obtenus dans l'essai tournant:

Substance d'essai	Nombre total de résultats n_1	Dégradation moyenne (sur l'ensemble des résultats) (%)	Écart-type relatif (sur l'ensemble des résultats) (%)	Résultats valables n_2	Dégradation moyenne (sur les résultats valables) (%)	Écart-type relatif (sur les résultats valables) (%)	Résultats affichant >60 % dégradation dans les essais valables n_3
Acide palmitique	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Polyéthylène glycol 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Proportion de n_2

12. Les coefficients de variation autour de la moyenne de tous les résultats obtenus avec l'acide palmitique et le polyéthylèneglycol 400 ont atteint respectivement 45 % (n = 36) et 35 % (n = 38). En écartant les valeurs < 40 % et > 100 % (attribuées à des conditions sous-optimales dans le premier cas et à des causes inconnues dans le second), on ramène leurs coefficients de variation respectifs à 26 % et 23 %. Les proportions de valeurs «valables» atteignant au moins 60 % de dégradation étaient de 70 % pour l'acide palmitique et de 83 % pour le polyéthylèneglycol 400. Les proportions du pourcentage de biodégradation calculées à partir des mesures du carbone inorganique dissous étaient relativement faibles, mais variables. Ces proportions s'échelonnent entre 0 et 35 % (moyenne de 12 % et coefficient de variation de 92 %), s'agissant de l'acide palmitique, et entre 0 et 40 % (moyenne de 24 % et coefficient de variation de 54 %), dans le cas du polyéthylèneglycol 400.

DESCRIPTION DU PROCÉDÉ EXPÉRIMENTAL

Appareillage

13. Matériel courant de laboratoire et:

a. incubateur anti-étincelles et thermostaté à 35 °C ± 2 °C;

▼M6

b. récipients expérimentaux en verre résistant à la pression et d'une capacité nominale appropriée ([1]), munis d'un septum étanche aux gaz, capable de supporter une pression d'environ 2 bars. Le volume de l'espace libre occupe environ 10 à 30 % du volume total. Si le dégagement de biogaz est régulier, un volume de 10 % convient, mais si le dégagement gazeux ne se produit qu'à la fin de l'essai, ce volume doit s'élever à 30 %. On recommande d'utiliser des flacons à sérum en verre d'un volume nominal de 125 ml et d'un volume total d'environ 160 ml, obturés par des septums ([2]) adaptés aux flacons à sérum et fixés par des surcapsules en aluminium, lorsqu'il y a un dégagement de pression à chaque prélèvement;

c. manomètre capable de mesurer ([3]) et de laisser s'échapper le gaz produit, par exemple un manomètre manuel de précision connecté à une aiguille de seringue appropriée; un robinet à trois voies étanche aux gaz facilite la libération de la pression excédentaire (Appendice 1). Le volume interne des tuyaux et du robinet du transducteur de pression doit être aussi petit que possible, de telle sorte que les erreurs introduites du fait de négliger le volume de l'appareillage ne soient pas significatives.

Note: les pressions relevées sont utilisées directement pour calculer la quantité de carbone produite dans l'espace libre (paragraphes 42 à 44). Sinon, les pressions relevées peuvent également être converties en volumes (à 35 °C, à la pression atmosphérique) de gaz produit au moyen d'un graphique de conversion. Ce graphique est dressé à partir des données obtenues en injectant des volumes connus d'azote gazeux dans une série de récipients d'essai (par exemple des flacons à sérum) à 35 °C ± 2 °C et en notant les valeurs résultantes de la pression stabilisée (voir Appendice 2). Le calcul est exposé dans la note du paragraphe 44.

Avertissement: prendre garde de ne pas se blesser avec les aiguilles des microseringues;

d. analyseur de carbone, capable de déterminer directement le carbone inorganique dans la gamme comprise entre 1 mg/l et 200 mg/l;

e. seringues à haute précision pour les échantillons gazeux et liquides;

f. agitateurs magnétiques (facultatif);

g. boîte à gants (recommandé).

Réactifs

14. Utiliser des réactifs de qualité pour analyse tout au long de l'essai.

([1]) La capacité préconisée est comprise entre 0,1 et 1 litre.

([2]) II est recommandé d'utiliser des septums en silicone étanches aux gaz et de vérifier leur étanchéité aux gaz, surtout dans le cas des septums en caoutchouc butylique, étant donné que plusieurs septums vendus dans le commerce ne sont pas suffisamment étanches au méthane et que certains septums ne sont plus étanches une fois qu'ils ont été percés par une aiguille dans les conditions de l'essai.

([3]) Cet instrument devrait être utilisé et étalonné régulièrement, conformément aux instructions du fabricant. Si on utilise un manomètre de la qualité prescrite, par exemple encapsulé avec une membrane en acier, il n'est pas nécessaire de l'étalonner au laboratoire. L'exactitude de l'étalonnage peut être vérifiée au laboratoire par une mesure unique effectuée à 1×10^5 Pa et comparée à la même mesure réalisée avec un manomètre à affichage mécanique. Si ce point est mesuré correctement, la linéarité ne sera pas altérée. Si on utilise d'autres instruments de mesure (dont l'étalonnage n'est pas garanti par le fabricant), il est recommandé de les étalonner sur la totalité de la gamme des valeurs, à intervalles réguliers.

▼M6

Eau

15. Eau distillée ou désionisée (désoxygénée par barbotage avec de l'azote gazeux renfermant moins de 5 µ1/l d'oxygène), contenant moins de 2 mg/l de carbone organique dissous.

Milieu d'essai

16. Préparer un milieu de dilution contenant les ingrédients suivants dans les quantités spécifiées:

Dihydrogénophosphate de potassium anhydre (KH_2PO_4)	0,27 g
Hydrogénophosphate de sodium dodécahydraté ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$))	1,12 g
Chlorure d'ammonium (NH_4Cl)	0,53 g
Chlorure de calcium dihydraté ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,075 g
Chlorure de magnésium hexahydraté ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,10 g
Chlorure de fer (II) tétrahydraté ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,02 g
Résazurine (indicateur d'oxygène)	0,001 g
Sulfure de sodium nonahydraté ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	0,10 g
Solution mère d'oligo-éléments (facultatif, paragraphe 18)	10 ml
Ajouter de l'eau désoxygénée (paragraphe 15) pour porter le volume à	1 litre-

Note: s'il est impossible d'utiliser du sulfure de sodium fraîchement préparé, il faut le laver et le sécher avant l'emploi, afin qu'il soit suffisamment réducteur. Cet essai peut être conduit sans boîte à gants (voir paragraphe 26). Dans ce cas, la concentration finale de sulfure de sodium dans le milieu peut être portée à 0,20 g de $Na_2S \cdot 9H_2O$ par litre. Le sulfure de sodium peut aussi être ajouté à partir d'une solution mère anaérobie appropriée à travers le septum des récipients d'essai fermés, ce mode opératoire diminuant le risque d'oxydation. Le sulfure de sodium peut être remplacé par du citrate de titane (III). Ce dernier est introduit à travers le septum des récipients d'essai fermés de telle sorte que sa concentration finale y atteigne 0,8 à 1,0 mmol/l/l. Le citrate de titane (III) est un agent réducteur très efficace et peu toxique que l'on prépare comme suit: dissoudre 2,94 g de citrate de sodium dihydraté dans 50 ml d'eau désoxygénée (afin d'obtenir une solution à 200 mmol/l) et ajouter 5 ml d'une solution de chlorure de titane (III) à 15 % (poids/volume). Neutraliser à pH 7 ± 0,2 avec une base minérale et verser dans un récipient approprié sous un jet d'azote. La concentration de citrate de titane (III) dans cette solution mère est de 164 mmol/l.

17. Mélanger les ingrédients du milieu expérimental à l'exception de l'agent réducteur (sulfure de sodium, citrate de titane) et faire barboter de l'azote gazeux dans la solution durant environ 20 minutes, juste avant son utilisation, pour enlever l'oxygène. Ajouter ensuite le volume qui convient de la solution fraîchement préparée (dans de l'eau désoxygénée) de l'agent réducteur, juste avant d'utiliser le milieu. Ajuster le pH du milieu, si nécessaire, avec un acide ou une base minéraux dilués à 7 ± 0,2.

▼M6

Solution mère d'oligo-éléments (facultatif)

18. Il est recommandé d'utiliser un milieu d'essai contenant les oligo-éléments suivants, afin d'améliorer les processus de dégradation anaérobie, surtout si les concentrations d'inoculum sont faibles (par exemple 1 g/l) (11).

Chlorure de manganèse tétrahydraté ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50 mg
Acide borique (H_3BO_3)	5 mg
Chlorure de zinc ($ZnCl_2$)	5 mg
Chlorure de cuivre (II) ($CuCl_2$)	3 mg
Molybdate de sodium dihydraté ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	1 mg
Chlorure de cobalt hexahydraté ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	100 mg
Chlorure de nickel hexahydrat ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	10 mg
Sélénite de sodium (Na_2SeO_3)	5 mg
Ajouter de l'eau désoxygénée (paragraphe 15) pour porter le volume à	1 litre

Substance d'essai

19. Ajouter la substance d'essai véhiculée dans une solution, suspension ou émulsion mère ou directement, à l'état solide ou liquide, ou adsorbée sur un filtre en fibres de verre, de façon à obtenir une concentration ne dépassant pas 100 mg/l de carbone organique. Si l'on emploie une solution mère, préparer une solution appropriée avec de l'eau (paragraphe 15) préalablement désoxygénée par barbotage avec de l'azote gazeux, d'une concentration telle que le volume ajouté soit inférieur à 5 % du volume total du mélange réactionnel. Ajuster le pH de la solution mère à 7 ± 0,2, si nécessaire. Pour les substances d'essai insuffisamment solubles dans l'eau, se reporter à la norme ISO 10634 (13). Si l'on utilise un solvant, préparer un témoin supplémentaire dans lequel seul le solvant est ajouté au milieu inoculé. Les solvants organiques dont on sait qu'ils inhibent la production de méthane, tels que le chloroforme et le tétrachlorure de carbone, sont à éviter.

Avertissement — Les substances d'essai toxiques et celles dont les propriétés sont inconnues sont à manipuler avec précaution.

Substances de référence

20. Des substances de référence, telles que le benzoate de sodium, le phénol et le polyéthylèneglycol 400, ont déjà permis de vérifier correctement le mode opératoire, puisqu'elles sont biodégradées à plus de 60 % en l'espace de 60 jours. Préparer une solution mère (dans de l'eau désoxygénée) de la substance de référence choisie, de la même manière que la solution de substance d'essai, et ajuster le pH à 7 ± 0,2, si nécessaire.

Témoin de l'inhibition (facultatif)

21. Pour obtenir des informations sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes anaérobies, afin de trouver la concentration expérimentale la plus appropriée, ajouter la substance d'essai et la substance de référence dans un récipient contenant le milieu expérimental (voir paragraphe 16), chacune à la même concentration que celle à laquelle elles ont été ajoutées dans le milieu d'essai lors de l'essai (voir les paragraphes 19 et 20, ainsi que la norme ISO 13641-1 (12)).

▼M6

Boue digérée

22. Prélever de la boue digérée dans le digesteur d'une station d'épuration qui traite principalement des eaux usées domestiques. Cette boue doit être caractérisée de façon exhaustive et les informations de référence doivent être incluses dans le rapport (voir paragraphe 54). Si l'on projette d'employer un inoculum adapté, on pourra peut-être recueillir la boue digérée dans une station d'épuration d'effluents industriels. Utiliser des bouteilles à large ouverture en polyéthylène à haute densité ou d'une matière semblable, capables de se dilater, pour collecter la boue digérée. Remplir ces bouteilles de boue jusqu'à environ 1 cm de leur embouchure et les fermer hermétiquement, de préférence avec une soupape de sécurité. Après son arrivée au laboratoire, la boue récoltée peut être utilisée directement ou placée dans un digesteur à l'échelle du laboratoire. Libérer l'excès de biogaz en ouvrant les bouteilles de boue avec précaution. Sinon, une boue anaérobie cultivée en laboratoire peut également être utilisée comme source d'inoculum, mais son spectre d'activité risque d'avoir été altéré.

Avertissement — Les boues digérées comportent des risques d'incendie et d'explosion à cause des gaz inflammables qu'elles dégagent, elles renferment également des organismes potentiellement pathogènes, de sorte que ces boues sont à manipuler avec prudence. Pour des raisons de sécurité, il ne faut pas recueillir les boues dans des récipients en verre.

23. Pour réduire la production gazeuse de fond et diminuer l'influence des témoins à blanc, on peut envisager de prédigérer la boue. Si une prédigestion s'avère nécessaire, on laisse la boue subir une digestion sans l'additionner d'éléments nutritifs ou de substrats à 35 °C ± 2 °C pendant sept jours au maximum. On a constaté, pour quelques substances testées, qu'une prédigestion d'environ 5 jours entraîne habituellement une diminution optimale de la production gazeuse dans le témoin à blanc, qui ne s'accompagne pas d'une prolongation inacceptable de la phase de latence ou des périodes d'incubation durant la phase d'essai, ni d'une perte d'activité.

24. Pour les substances d'essai qui sont, ou risquent d'être, peu biodégradables, on envisagera de préexposer la boue à la substance d'essai, afin d'obtenir un inoculum mieux adapté. Dans ce cas, ajouter la substance d'essai à raison de 5 mg/l à 20 mg/l de carbone organique à la boue digérée et incuber ce mélange durant deux semaines au maximum. Laver soigneusement la boue préexposée avant de l'utiliser (voir paragraphe 25) et stipuler les conditions de la préexposition dans le rapport d'essai.

Inoculum

25. Laver la boue juste avant son emploi (paragraphes 22 à 24), afin d'abaisser la concentration de carbone inorganique à moins de 10 mg/l dans la suspension expérimentale finale. Centrifuger la boue dans des tubes hermétiquement clos (par exemple pendant 5 minutes à 3 000 g) et jeter le surnageant. Suspendre le culot dans un milieu désoxygéné (paragraphes 16 et 17), centrifuger à nouveau la suspension et éliminer le liquide surnageant. Si la teneur en carbone inorganique n'a pas été suffisamment réduite, le lavage de la boue peut encore être répété deux fois au maximum. Ce traitement ne semble pas nuire aux micro-organismes. Enfin, suspendre le culot dans le volume requis de milieu expérimental et déterminer la concentration des solides totaux [voir, par exemple, ISO 11923 (15)]. La concentration finale des solides totaux dans les récipients d'essai doit être comprise entre 1 g/let 3 g/l (ou environ 10 % de la concentration dans la boue digérée non diluée). Mener les opérations ci-dessus en s'efforçant de préserver autant que possible la boue de tout contact avec l'oxygène (par exemple dans une atmosphère azotée).

▼**M6**

MODE OPÉRATOIRE

26. Conduire les étapes initiales suivantes en appliquant des techniques permettant de limiter au maximum le contact entre la boue digérée et l'oxygène; il peut par exemple être nécessaire de travailler dans une boîte à gants sous atmosphère azotée et/ou de purger les flacons avec de l'azote (4).

Préparation des récipients d'essai et des récipients témoins

27. Préparer des récipients en au moins trois exemplaires (voir paragraphe 13-b) pour la substance d'essai, les témoins à blanc, la substance de référence, les témoins d'inhibition (le cas échéant) ainsi que des enceintes manostatées (option facultative) (voir paragraphes 7 et 19 à 21). On peut également préparer des récipients supplémentaires pour évaluer la biodégradation primaire par des procédés analytiques spécifiques de la substance d'essai. Le même ensemble de récipients témoins à blanc peut être utilisé pour plusieurs substances soumises au même essai, à condition que les volumes de l'espace libre soient homogènes.

28. Préparer l'inoculum dilué avant de l'ajouter aux récipients, par exemple au moyen d'une pipette à large embouchure. Ajouter des aliquotes de l'inoculum bien mélangé (paragraphe 25), de telle sorte que la concentration des solides totaux soit identique dans tous les récipients (entre 1 g/l et 3 g/l). Ajouter les solutions mères de la substance d'essai et de la substance de référence, après avoir ajusté le pH à 7 ± 0,2, si nécessaire. Il convient d'ajouter les substances d'essai et de référence dans le véhicule le plus approprié (voir paragraphe 19).

29. La concentration expérimentale en carbone organique doit normalement se situer entre 20 et 100 mg/l (paragraphe 4). Si la substance d'essai est toxique, la concentration expérimentale doit être réduite à 20 mg de C/l, ou même moins si seule la biodégradation primaire est à mesurer (par des analyses spécifiques). Il est à noter que la variabilité des résultats de l'essai augmente aux basses concentrations expérimentales.

30. Dans les récipients témoins à blanc, ajouter une quantité équivalente du véhicule utilisé pour ajouter la substance d'essai, à la place de la solution, suspension ou émulsion mère. Si la substance d'essai a été introduite sur un support en fibres de verre (filtre) ou à l'aide de solvants organiques, ajouter un filtre dans les témoins à blanc ou un volume de solvant équivalent à celui qui a été évaporé. Inclure un récipient d'essai supplémentaire contenant la substance d'essai pour y mesurer le pH. Ajuster le pH à 7 ± 0,2, si nécessaire, avec de petites quantités de base ou d'acide minéraux dilués. On ajoute la même quantité d'agent neutralisant à tous les récipients d'essai. Ces ajouts ne devraient pas être nécessaires étant donné que le pH des solutions mères de la substance d'essai et de la substance de référence a déjà été ajusté (voir paragraphes 19 et 20). S'il faut mesurer la biodégradation primaire, on prélève un échantillon approprié dans le récipient destiné à l'analyse du pH ou dans un récipient d'essai supplémentaire et on mesure la concentration de la substance d'essai par une analyse spécifique. Si le mélange réactionnel requiert une agitation, des aimants enrobés peuvent être déposés dans tous les récipients (facultatif).

31. S'assurer que le volume total du liquide V_l et le volume de l'espace libre V_h sont identiques dans tous les récipients; relever et consigner les valeurs de V_l et V_h. Chaque récipient doit être fermé hermétiquement au moyen d'un septum étanche aux gaz et transféré de la boîte à gants (paragraphe 26) dans l'incubateur (voir paragraphe 13-a))

▼M6

Substances d'essai insolubles

32. Les quantités pesées de substances peu solubles dans l'eau sont versées directement dans les récipients préparés. Si le recours à un solvant s'avère nécessaire (voir paragraphe 19), transférer la solution ou la suspension de substance d'essai dans les récipients vides. Si possible, évaporer le solvant en faisant circuler de l'azote gazeux dans les récipients, avant d'ajouter les autres ingrédients, à savoir la boue diluée (paragraphe 25) et l'eau désoxygénée, comme indiqué. Un témoin supplémentaire au solvant doit également être préparé (paragraphe 19). La norme ISO 10634 (13) présente d'autres méthodes d'ajout de substances insolubles. Les substances d'essai liquides peuvent être introduites avec une seringue dans les récipients complètement préparés et hermétiquement fermés, si l'on s'attend à ce que le pH initial ne dépasse pas 7 ± 1, sinon ajouter la substance d'essai comme indiqué plus haut (paragraphe 19).

Incubation et mesures de la pression gazeuse

33. Incuber les récipients préparés à 35 °C ± 2 °C durant environ une heure, afin que leur contenu s'équilibre, et évacuer l'excès de gaz dans l'atmosphère, par exemple en secouant chaque récipient, l'un après l'autre, et en y insérant l'aiguille du manomètre (paragraphe 13-c) à travers le septum, puis en ouvrant le robinet jusqu'à ce que le manomètre indique zéro. Si à ce stade, ou lorsqu'on pratique des mesures intermédiaires, la pression de l'espace libre est inférieure à la pression atmosphérique, il faut rajouter de l'azote gazeux afin de rétablir la pression atmosphérique. Fermer le robinet (voir paragraphe 13-c) et incuber les récipients à l'obscurité, en s'assurant que toutes les parties des récipients sont maintenues à la température de la digestion. Observer les récipients après 24 à 48 heures d'incubation. Écarter les récipients dont le liquide surnageant présente une coloration rose bien nette, autrement dit, où la résazurine (voir paragraphe 16) a viré, révélant la présence d'oxygène (voir paragraphe 50). Bien que le système puisse tolérer de petites quantités d'oxygène, des concentrations plus importantes risquent d'inhiber fortement la biodégradation anaérobie. Le rejet occasionnel d'un seul récipient sur un ensemble de trois récipients identiques est acceptable, mais des rejets plus fréquents doivent amener l'expérimentateur à vérifier le mode opératoire et à recommencer l'essai.

34. Mélanger soigneusement le contenu de chaque récipient en le remuant ou en agitant le récipient pendant quelques minutes, au moins 2 ou 3 fois par semaine et peu avant chaque mesure de la pression. L'agitation resuspend l'inoculum et permet d'équilibrer les gaz. Toutes les pressions sont à mesurer rapidement, les récipients d'essai pouvant subir une baisse de température induisant un affichage de valeurs erronées. Lorsqu'on mesure la pression, la totalité du récipient d'essai, y compris l'espace libre, doit être maintenue à la température de la digestion. Mesurer la pression gazeuse, par exemple en insérant l'aiguille à seringue connectée au manomètre à travers le septum (paragraphe 13-c). Veiller à ne pas laisser entrer d'eau dans l'aiguille; si cela se produit, sécher les parties humides et placer une nouvelle aiguille. La pression est à mesurer en millibars (voir paragraphe 42). La pression gazeuse régnant dans les récipients peut être mesurée périodiquement, par exemple une fois par semaine, et éventuellement l'excès de gaz peut être évacué dans l'atmosphère. Sinon, on peut aussi ne mesurer la pression qu'à la fin de l'essai, afin de déterminer la quantité de biogaz produite.

35. On préconise de relever les pressions gazeuses intermédiaires, parce que l'augmentation de la pression indique à quel moment l'essai peut être achevé et permet de suivre la cinétique (voir paragraphe 6).

▼M6

36. Normalement, l'essai prend fin après une période d'incubation de 60 jours, à moins que la courbe de biodégradation obtenue à partir des mesures de la pression ait atteint un plateau avant; cette phase de plateau, où la courbe marque un pallier, correspond à la biodégradation maximale. Si le plateau atteint moins de 60 %, l'interprétation est délicate parce que cela signifie qu'une partie seulement de la molécule a été minéralisée ou qu'une erreur a été commise. Si, à l'issue de la période d'incubation normale, du gaz se dégage alors que la phase plateau n'a manifestement pas été atteinte, on envisagera de prolonger l'essai pour vérifier si la courbe parvient finalement au plateau (> 60 %).

Mesure du carbone inorganique

37. À la fin de l'essai, après la dernière mesure de la pression gazeuse, laisser la boue au repos. Ouvrir chaque récipient, l'un après l'autre, et prélever immédiatement un échantillon en vue de déterminer la concentration (mg/l) du carbone inorganique dans le liquide surnageant. Le liquide surnageant ne peut être ni centrifugé ni filtré, car ces traitements entraîneraient une perte inacceptable de dioxyde de carbone dissous. Si le surnageant ne peut être analysé juste après avoir été prélevé, stocker ce dernier dans une fiole hermétiquement fermée, sans espace libre, et refroidie à environ 4 °C, pendant deux jours au maximum. Après avoir mesuré le carbone inorganique, mesurer et enregistrer la valeur du pH.

38. Sinon, le carbone inorganique présent dans le surnageant peut être déterminé indirectement, d'après le rejet de carbone inorganique dissous sous la forme de dioxyde de carbone mesurable dans l'espace libre. Après la dernière mesure de pression gazeuse, ramener la pression régnant dans chaque récipient d'essai à la pression atmosphérique. Acidifier le contenu de chaque récipient d'essai à environ pH 1 en ajoutant un acide minéral concentré (par exemple H_2SO_4), à travers le septum des récipients hermétiquement fermés. Incuber les récipients secoués à 35 °C ± 2 °C durant environ 24 heures et mesurer au manomètre la pression gazeuse résultant du dioxyde de carbone dégagé.

39. Effectuer les mêmes relevés pour le témoin à blanc, le témoin contenant la substance de référence et, le cas échéant, les témoins d'inhibition (voir paragraphe 21).

40. Dans certains cas, en particulier si les mêmes récipients témoins sont utilisés pour plusieurs substances d'essai, on envisagera de mesurer, si nécessaire, les concentrations intermédiaires de carbone inorganique dans les récipients d'essai et les récipients témoins. Dans ce cas, il faut prévoir un nombre suffisant de récipients pour toutes les mesures intermédiaires. Il est préférable de procéder de cette manière plutôt que de prélever tous les échantillons dans le même récipient. Cette dernière option ne peut être retenue que si le volume nécessaire à l'analyse du carbone inorganique dissous ne semble pas trop important. Le carbone inorganique dissous est mesuré après la mesure de la pression gazeuse, mais sans que le gaz excédentaire ait été évacué, comme décrit ci-dessous:

— prélever des échantillons de surnageant d'un volume aussi petit que possible, en introduisant une seringue à travers le septum, sans ouvrir les récipients, et déterminer la teneur en carbone inorganique de l'échantillon;

— après avoir prélevé l'échantillon, évacuer éventuellement le gaz excédentaire;

— il faut tenir compte du fait qu'une diminution, même minime, du volume du surnageant (par exemple de 1 %) peut entraîner une augmentation sensible du volume du gaz occupant l'espace libre (V_h);

— si nécessaire, les équations (voir paragraphe 44) sont corrigées par une augmentation de la valeur de V_h dans l'équation 3.

▼M6

Analyses spécifiques

41. S'il y a lieu de déterminer la dégradation anaérobie primaire (voir paragraphe 30), prélever un échantillon d'un volume suffisant pour les analyses spécifiques, au début et à la fin de l'essai, dans les récipients contenant la substance d'essai. Il est à noter que, si ce prélèvement est effectué, les volumes de l'espace libre (V_h) et du liquide (V_l) sont modifiés et il faut en tenir compte dans le calcul de la production gazeuse. Sinon, il est également possible de prélever des échantillons destinés aux analyses spécifiques dans des mélanges supplémentaires, prévus à cette fin (paragraphe 30).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

42. Pour des raisons pratiques, la pression du gaz est mesurée en millibars (1 mbar = 1 hPa = 10^2 Pa; 1 Pa = 1 N/m^2), le volume en litres et la température en degrés Celsius.

Carbone dans l'espace libre

43. Sachant qu'une mole de méthane et une mole de dioxyde de carbone contiennent chacune 12 g de carbone, la masse de carbone dans un volume donné de gaz dégagé peut être exprimée par l'équation suivante:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Équation [1]}$$

où:

m = masse de carbone (mg) dans un volume donné de gaz dégagé;

12 = masse atomique relative du carbone;

n = nombre de moles de gaz dans le volume donné.

Si un gaz autre que le méthane ou le dioxyde de carbone (par exemple du N_2O) se dégage en quantité considérable, il convient de modifier la formule [1], de façon à décrire la possibilité d'effets engendrés par les gaz dégagés.

44. D'après les lois sur les gaz, n peut s'exprimer par:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Équation [2]}$$

où:

p = pression du gaz (Pascals);

V = volume du gaz (m^3);

R = constante molaire des gaz [8,314 J/(mol K)];

T = température d'incubation (Kelvins).

En combinant les équations [1] et [2] et en adaptant la formule pour tenir compte de la production de gaz dans le témoin à blanc,

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0{,}1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Équation [3]} \quad \text{où:}$$

m_h = masse de carbone net produite sous forme de gaz dans l'espace libre (mg);

Δp = moyenne de la différence entre les pressions initiale et finale dans les récipients d'essai moins la moyenne correspondante dans les récipients témoins à blanc (millibars);

▼M6

V_h = volume de l'espace libre dans le récipient (litres).

0,1 = facteur permettant de convertir à la fois les newtons/m^2 en millibars et les m^3 en litres.

L'équation [4] devrait être utilisée pour la température normale d'incubation, à savoir 35 °C (308 K):

$$m_h = 0{,}468(\Delta p \cdot V_h) \qquad \text{Équation [4]}$$

Note: Autre mode de calcul du volume: les pressions lues sur le manomètre sont converties en ml de gaz produit à l'aide de la courbe de référence tracée en portant le volume injecté (ml) en fonction des valeurs relevées sur le manomètre (Appendice 2). On calcule le nombre de moles (n) de gaz dans l'espace libre de chaque récipient en divisant la production de gaz cumulée (ml) par 25 286 ml/mole, valeur qui correspond au volume occupé par une mole de gaz à 35 °C à pression atmosphérique normale. Étant donné qu'une mole de CH_4 et une mole de CO_2 contiennent chacune 12 g de carbone, la quantité de carbone (mg) dans l'espace libre (m_h) est donnée par l'équation [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \qquad \text{Équation [5]}$$

En adaptant la formule pour tenir compte de la production de gaz dans le témoin à blanc,

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0{,}475\Delta V \qquad \text{Équation [6]}$$

où:

m_h = masse de carbone net produite sous forme de gaz dans l'espace libre (mg);

ΔV = moyenne de la différence entre le volume de gaz produit dans l'espace libre des récipients d'essai et le volume de gaz produit dans l'espace libre des récipients témoins à blanc

25286 = volume occupé par une mole de gaz à 35 °C et sous 1 atmosphère.

45. Il est possible de suivre le déroulement de la biodégradation en portant sur un graphique l'accroissement de pression cumulé Δp (millibars) en fonction du temps, s'il y a lieu. À partir de cette courbe, mettre en évidence et noter la phase de latence (jours). La phase de latence correspond au temps écoulé entre le début de l'essai et le moment où la dégradation commence à être sensible (l'Appendice 3 en donne un exemple). Si des échantillons intermédiaires de surnageant sont prélevés et analysés (paragraphes 40, 46 et 47), alors le carbone total produit (dans le gaz et dans le liquide) peut être porté sur le graphique à la place de la seule pression cumulée.

Carbone dans le liquide

46. On néglige la quantité de méthane dans le liquide, sachant que sa solubilité dans l'eau est très faible. Calculer la masse de carbone inorganique dans le liquide des récipients d'essai à l'aide de l'équation [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \qquad \text{Équation [7]}$$

où:

m_l = masse de carbone inorganique dans le liquide (mg);

Cent = concentration de carbone inorganique dans les récipients d'essai moins cette même concentration dans les récipients témoins à la fin de l'essai (mg/l);

V_l = volume de liquide dans le récipient (litres).

▼M6

Carbone gazéifié total

47. Calculer la masse totale de carbone gazéifié dans le récipient au moyen de l'équation [8]:

$$m_t = m_h + m_l \qquad \text{Équation [8]}$$

où:

m_t = masse totale de carbone gazéifié (mg);

$m_h + m_l$ sont comme définis plus haut.

Carbone de la substance d'essai

48. Calculer la masse de carbone (provenant de la substance d'essai ajoutée) dans les récipients d'essai à l'aide de l'équation [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \qquad \text{Équation [9]}$$

où:

m_v = masse de carbone de la substance d'essai (mg);

C_c = concentration du carbone de la substance d'essai dans le récipient d'essai (mg/l);

V_l = volume de liquide dans le récipient d'essai (litres).

Ampleur de la biodégradation

49. Calculer le pourcentage de biodégradation d'après le gaz présent dans l'espace libre à l'aide de l'équation [10] et le pourcentage total de biodégradation avec l'équation [11]:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \qquad \text{Équation [10]}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \qquad \text{Équation [11]}$$

où:

D_h = biodégradation d'après le gaz présent dans l'espace libre (%);

D_t = biodégradation totale (%);

m_h, m_v et m_t sont définis comme plus haut.

Le degré de biodégradation primaire est calculé d'après les mesures (facultatives) de la concentration de la substance d'essai au début et à la fin de l'incubation, à l'aide de l'équation [12]:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \qquad \text{Équation [12]}$$

où:

D_p = dégradation primaire de la substance d'essai (%);

S_i = concentration initiale de la substance d'essai (mg/l);

S_e = concentration finale de la substance d'essai (mg/l).

Si la méthode d'analyse fait apparaître des concentrations significatives de substance d'essai dans l'inoculum de boue anaérobie non traité, utiliser l'équation [13]:

▼M6

$$D_p^{\,1} = [1 - (S_e - S_{eb})/(S_i - S_{ib})] \times 100 \quad \text{Équation [13]}$$

où:

$D_p^{\,1}$ = dégradation primaire corrigée de la substance d'essai (%);

S_{ib} = concentration initiale «apparente» de la substance d'essai dans les témoins à blanc (mg/l);

S_{eb} = concentration finale «apparente» de la substance d'essai dans les témoins à blanc (mg/l).

Validité des résultats

50. Seules les pressions relevées dans les récipients ne présentant pas de coloration rose (voir paragraphe 33) peuvent être utilisées. La contamination par l'oxygène est réduite au minimum par des techniques adéquates de manipulation en anaérobiose.

51. Il faut considérer que l'essai est valable si la substance de référence atteint un plateau qui représente plus de 60 % de biodégradation ([1]).

52. Si, à la fin de l'essai, le pH sort de l'intervalle 7 ± 1 et que la biodégradation est insuffisante, recommencer l'essai en augmentant le pouvoir tampon du milieu.

Inhibition de la dégradation

53. La production de gaz dans les récipients contenant à la fois la substance d'essai et la substance de référence doit être au moins égale à celle enregistrée dans les récipients ne contenant que la substance de référence; sinon cela révèle une inhibition de la production de gaz. Dans certains cas, la production gazeuse dans les récipients renfermant la substance d'essai, mais pas la substance de référence est inférieure à celle régnant dans les récipients témoins à blanc: cela indique que la substance d'essai est inhibante.

Rapport d'essai

54. Le rapport d'essai doit inclure les informations suivantes:

Substance d'essai:

— nom courant, nom chimique, numéro CAS, formule structurale et propriétés physico-chimiques pertinentes;

— pureté (impuretés) de la substance d'essai.

Conditions expérimentales:

— volumes du liquide dilué du digesteur (V_l) et de l'espace libre (V_h) dans le récipient;

— description des récipients d'essai, des principales caractéristiques de la mesure du biogaz (par exemple, type de manomètre) et de l'analyseur de carbone inorganique;

— ajout des substances d'essai et de référence au système expérimental: concentration expérimentale employée et recours à un solvant, le cas échéant;

— détails sur l'inoculum utilisé: nom de la station d'épuration des eaux usées, description de la source des eaux usées traitées (par exemple, température des opérations, temps de rétention de la boue, origine principalement domestique, etc.), concentration, toutes les informations permettant d'étayer ce qui précède et renseignements sur le prétraitement éventuel de l'inoculum (par exemple prédigestion, préexposition);

— température d'incubation;

— nombre de récipients traités de manière identique.

([1]) Ce point est à réévaluer si des substances chimiques de référence adsorbantes et insolubles sont incluses.

▼M6

Résultats:

— valeurs du pH et du carbone inorganique à la fin de l'essai;

— concentration de la substance d'essai au début et à la fin de l'essai, si une mesure spécifique a été effectuée;

— toutes les valeurs mesurées dans les récipients d'essai, les témoins à blanc, les témoins contenant la substance de référence et les témoins d'inhibition, comme il convient [par exemple la pression en millibars, la concentration du carbone inorganique (mg/l)] sont présentées sous forme de tableau (les valeurs mesurées dans l'espace libre et le liquide doivent être rapportées séparément);

— traitement statistique des données, durée de l'essai et diagramme de la biodégradation de la substance d'essai, de la substance de référence et du témoin d'inhibition;

— pourcentage de biodégradation de la substance d'essai et de la substance de référence;

— motifs du rejet éventuel des résultats;

— analyse des résultats.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Chapitres suivant de la présente annexe:

C.4. Détermination de la biodégradabilité facile;

C.9. Biodégradation — Essai de Zahn et Wellens;

C.10. Essai de simulation — Traitement aérobie des eaux usées:

A: Unités de traitement par boues activées; B: Biofilms

C.11. Biodégradation — Boues activées: essai d'inhibition de la respiration

(2) OCDE (2009) Biodégradabilité dite intrinsèque: Essai MITI modifié (II), Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimique n° 302 C, OCDE, Paris

(3) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga,U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550. (Also published as ECETOC Technical Report No. 28, June 1988).

(4) Shelton D.R. and Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Environ. Mircobiology, 47, 850-857.

(5) Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. and McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. Water Res. 13, 485-492.

(6) Healy, J.B.Jr. and Young, L.Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. Appl. Environ. Microbiol. 38, 84-89.

(7) Gledhill, W.E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.

(8) Battersby, N.S. and Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. Chemosphere, 17, 2441-2460.

(9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.

▼M6

(10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.

(11) Organisation internationale de normalisation (1995) ISO 11 734 Qualité de l'eau — Évaluation de la biodégradabilité anaérobie «ultime» des composés organiques dans les boues de digesteurs — Méthode par mesurage de la production de biogaz.

(12) Organisation internationale de normalisation (2003) ISO 13 641-1 Qualité de l'eau — Détermination de l'inhibition de la production de gaz des bactéries anaérobies — Partie 1 Essai général.

(13) Organisation internationale de normalisation (1995) ISO 10 634 Qualité de l'eau — Lignes directrices pour la préparation et le traitement des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux.

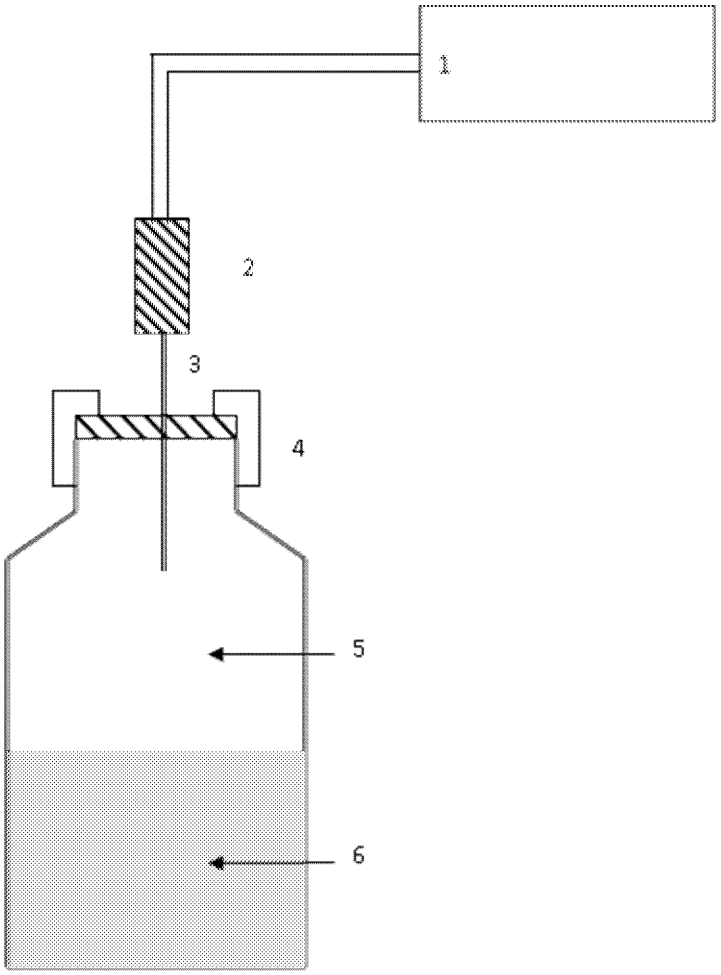
(14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. Chemosphere, 27, 1499-1509.

(15) Organisation internationale de normalisation (1997) ISO 11 923 Qualité de l'eau — Dosage des matières en suspension par filtration sur filtre en fibres de verre.

▼**M6**

Appendice 1

Exemple d'appareil permettant de mesurer la production de biogaz d'après la pression gazeuse



Légende:

1 — Manomètre

2 — Robinet à trois voies étanche aux gaz

3 — Aiguille de seringue

4 — Bouchon étanche aux gaz (septum serré sur le col du flacon par une surcapsule)

5 — Espace libre (V_h)

6 — Inoculum de boue digérée (V_I)

Récipients d'essai maintenus à 35 °C ± 2 °C

▼M6

Appendice 2

Conversion des mesures manométriques

Les pressions relevées peuvent être rapportées à des volumes gazeux à l'aide d'une courbe de référence obtenue en injectant des volumes d'air connus à 35 °C ± 2 °C dans des flacons à sérum contenant un volume d'eau égal à celui du mélange réactionnel, V_R:

— Verser des aliquotes de V_R ml d'eau, maintenues à 35 °C ± 2 °C dans cinq flacons à sérum. Fermer les flacons hermétiquement et les plonger dans un bain d'eau à 35 °C durant 1 heure pour les laisser s'équilibrer.

— Enclencher le manomètre, attendre qu'il se stabilise et le mettre à zéro.

— Insérer l'aiguille de la seringue à travers le bouchon de l'un des flacons, ouvrir le robinet jusqu'à ce que le manomètre indique zéro et fermer le robinet.

— Répéter ce processus avec les autres flacons.

— Injecter 1 ml d'air à 35 °C ± 2 °C dans chaque flacon. Insérer l'aiguille (montée sur le manomètre) à travers le bouchon de l'un des flacons et attendre que la valeur affichée sur le manomètre se stabilise. Noter la pression, ouvrir le robinet jusqu'à ce que la pression retombe à zéro puis fermer le robinet.

— Répéter ce processus avec les autres flacons.

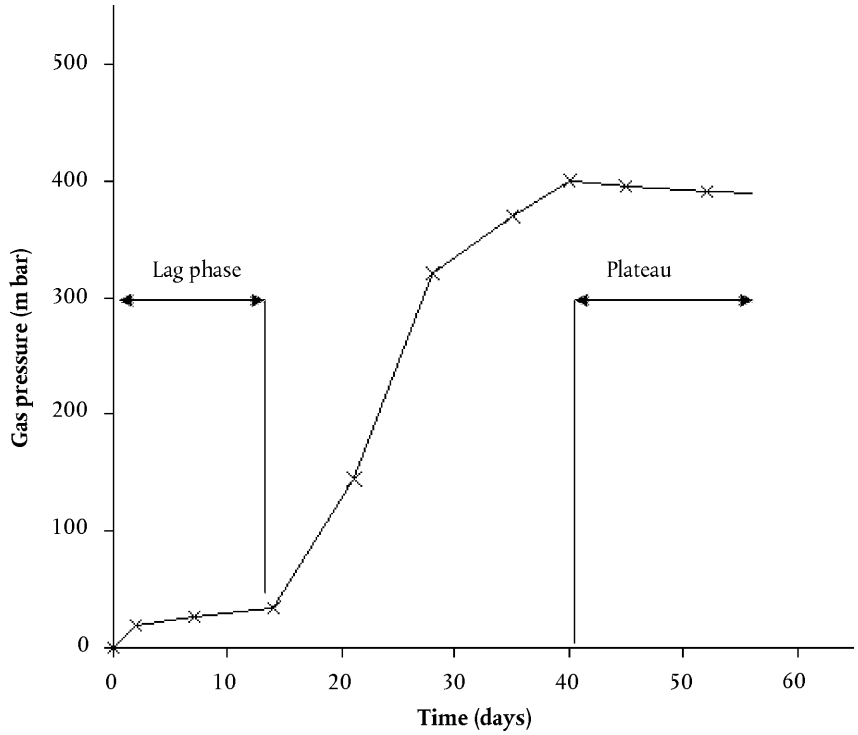
— Répéter la totalité du processus en appliquant des volumes d'air de 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml et 50 ml.

— Tracer une courbe de conversion de la pression (Pa) en fonction du volume de gaz injecté Vb (ml). La réponse de l'instrument est linéaire sur la gamme comprise entre 0 Pa et 70 000 Pa et entre 0 ml et 50 ml de gaz produit.

▼**M6**

Appendice 3

Exemple d'une courbe de dégradation (accroissement net cumulé de la pression en fonction de la durée exprimée en jours)



▼M6

Appendice 4

Exemple de tableau de résultats pour l'essai de biodégradation anaérobie — Tableau pour la substance d'essai

Laboratoire: ..... Substance d'essai: ..... Essai n°: .....

Température de l'essai (°C): ..... Volume de l'espace libre (V_h): ..... (l) Volume du liquide (V_l): ..... (litres)

Carbone dans la substance d'essai $C_{c,v}$: ..... (mg/l) m_v ([1]): ..... (mg)

Jour	p_1 (essai) (mbar)	p_2 (essai) (mbar)	p_3 (essai) (mbar)	p (essai) moyenne (mbar)	p_4 (blanc) (mbar)	p_5 (blanc) (mbar)	p_6 (blanc) (mbar)	p (blanc) moyenne (mbar)	p (nette) essai — blanc moyenne (mbar)	Δp (nette) cumulée (mbar)	m_h espace libre C ([2]) (mg)	D_h Biodégradation ([3]) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ essai (mg)	$C_{IC,\ 2}$ essai (mg)	$C_{IC,\ 3}$ essai (mg)	C_{IC} essai moyenne (mg)	$C_{IC,\ 4}$ blanc (mg)	$C_{IC,\ 5}$ blanc (mg)	$C_{IC,\ 6}$ blanc (mg)	C_{IC} blanc moyenne (mg)	$C_{IC,\ net}$ essai — blanc moyenne (mg)	m_l liquide C ([4]) (mg)	m_t total C ([5]) (mg)	D_t Biodégradation ([6]) (%)
CI (fin)												
pH (fin)												

([1]) Carbone dans le récipient d'essai, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$
([2]) Carbone dans l'espace libre, m_h (mg) à la température d'incubation normale (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$
([3]) Biodégradation calculée d'après le gaz présent dans l'espace libre, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$
([4]) Carbone dans le liquide, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$
([5]) Carbone gazéifié total, m_t (mg): $m_t + m_l$
([6]) Biodégradation totale, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100)/m_v$

02008R0440 — FR — 16.10.2019 — 008.001 — 2374

▼M6

Laboratoire: ..... Substance de référence: ..... Essai n°: .....

Température de l'essai (°C): ..... Volume de l'espace libre (V_h): ..... (l) Volume du liquide (V_l): ..... (litres):

Carbone dans la substance de référence $C_{c,v}$ (mg/l): ..... m_v ([1]) (mg): …

Jour	p_1 (réf.) (mbar)	p_2 (réf.) (mbar)	p_3 (réf.) (mbar)	p (réf.) moyenne (mbar)	p_4 (inhib.) (mbar)	p_5 (inhib.) (mbar)	p_6 (inhib.) (mbar)	p (inhib.) moyenne (mbar)	p (réf.) réf. — blanc (mbar)	Δp (réf.) cumulée (mbar)	m_h espace libre C ([2]) (mg)	D_h Biodégradation ([3]) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ réf. (mg)	$C_{IC,\ 2}$ réf. (mg)	$C_{IC,\ 3}$ réf. (mg)	C_{IC} réf. moyenne (mg)	$C_{IC,\ 4}$ inhib. (mg)	$C_{IC,\ 5}$ inhib. (mg)	$C_{IC,\ 6}$ inhib. (mg)	C_{IC} inhib. moyenne (mg)	$C_{IC,\ net}$ réf. — inhib. (mg)	m_l liquide C ([4]) (mg)	m_t total C ([5]) (mg)	D_t Biodégradation ([6]) (%)
CI (fin)												
pH (fin)												

([1]) Carbone dans le récipient d'essai, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$
([2]) Carbone dans l'espace libre, m_h (mg) à la température d'incubation normale (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$
([3]) Biodégradation calculée d'après le gaz présent dans l'espace libre, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$
([4]) Carbone dans le liquide, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$
([5]) Carbone gazéifié total, m_t (mg): $m_t + m_l$
([6]) Biodégradation totale, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100)/m_v$

02008R0440 — FR — 16.10.2019 — 008.001 — 2375

▼M6

C.44. **LIXIVIATION SUR DES COLONNES DE SOL**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 312(2004) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les produits chimiques de synthèse peuvent atteindre le sol directement, à la suite d'une application intentionnelle (produits agrochimiques, par exemple) ou indirectement (par exemple: véhiculés par les eaux usées → boues d'épuration → sol ou air → dépôts secs/humides). Pour évaluer les risques associés à ces substances, il est important d'estimer leur potentiel de transformation dans le sol et de migration (lixiviation) vers les couches plus profondes du sol jusqu'aux eaux souterraines.

2. Il existe plusieurs méthodes pour mesurer le potentiel de lixiviation des produits chimiques dans le sol dans des conditions contrôlées en laboratoire: la chromatographie en couche mince de sol, la chromatographie en couche épaisse de sol, la chromatographie sur colonne de sol et les mesures d'adsorption-désorption (1)(2). S'agissant des substances chimiques non ionisées, le coefficient de partage n-octanol/eau (P_{oe}) fournit une première évaluation de leurs potentiels d'adsorption et de lixiviation (3)(4)(5).

3. La méthode décrite dans la présente méthode d'essai fait appel à la chromatographie sur colonne de sol avec un sol dérangé (voir la définition à l'Appendice 1). Deux types d'expériences sont conduits pour déterminer i) le potentiel de lixiviation de la substance chimique d'essai et ii) le potentiel de lixiviation des produits de transformation (étude avec des résidus de sol incubé, aussi appelés résidus «âgés»), sur sols, dans des conditions contrôlées en laboratoire ([1]). La méthode d'essai s'appuie sur des méthodes existantes (6)(7)(8)(9)(10)(11).

4. Un atelier de l'OCDE sur la sélection des sols et des sédiments, tenu à Belgirate (Italie) en 1995 (12) a défini le nombre et les types de sols à utiliser dans cet essai. Il a également émis des recommandations concernant le prélèvement, la manipulation et le stockage des échantillons de sol destinés aux essais de lixiviation.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

5. Des colonnes composées d'un matériau suffisamment inerte (par exemple: verre, acier inoxydable, aluminium, Téflon, PVC, etc.) sont remplies de sol, puis saturées et équilibrées avec une solution de «pluie artificielle» (voir la définition à l'Appendice 1), et on les laisse s'égoutter. Ensuite, la surface de chaque colonne de sol est traitée avec la substance d'essai et/ou des résidus «âgés» de la substance chimique d'essai. Après quoi, on arrose les colonnes de sol avec la pluie artificielle et on recueille le lixiviat. Après la lixiviation, le sol est extrait des colonnes et sectionné en un nombre de segments déterminé en fonction des informations à tirer de l'étude. La substance d'essai présente dans chaque segment de sol et dans le lixiviat est analysée, de même que les produits de transformation ou d'autres substances intéressantes, le cas échéant.

APPLICABILITÉ DE LA MÉTHODE D'ESSAI

6. La méthode s'applique aux substances chimiques d'essai (non marquées ou radiomarquées, par exemple au ^{14}C), pour lesquelles il existe une méthode d'analyse suffisamment précise et sensible. L'essai ne convient pas aux substances volatiles dans le sol et l'eau, qui ne resteraient donc pas dans le sol et/ou le lixiviat dans les conditions expérimentales de cet essai.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE CHIMIQUE D'ESSAI

7. Des substances chimiques non marquées ou radiomarquées peuvent être utilisées pour mesurer le comportement de lixiviation dans des colonnes de sol. L'étude de la lixiviation des produits de transformation (résidus «âgés» de la substance chimique d'essai) et les déterminations du bilan

([1]) Les études de lixiviation sur colonne menées sur des produits phytosanitaires peuvent fournir des informations sur la mobilité de la substance d'essai et de ses produits de transformation et compléter les études de sorption.

▼M6

massique exigent des substances radiomarquées. Le marquage au ^{14}C est recommandé, mais d'autres isotopes, tels que ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P, peuvent également être utiles. Dans toute la mesure du possible, le marqueur devra être porté par le ou les fragments les plus stables de la molécule. La pureté de la substance chimique d'essai atteindra au moins 95 %.

8. La plupart des substances chimiques sont à appliquer sous forme isolée. Cependant, les substances actives des produits phytosanitaires peuvent être testées sous forme de préparation pour l'étude de la lixiviation de la substance parente, mais leur mise à l'essai sous forme isolée est fortement conseillée si le mélange risque d'affecter la vitesse de libération dans l'environnement (par exemple, préparations granulaires ou à libération régulée). Pour ce qui est d'adapter la conception de l'essai aux mélanges, il peut être utile de consulter les autorités réglementaires avant de conduire l'essai. Les études de lixiviation sur des résidus de sol incubé doivent être menées avec le composé parent à l'état pur.

9. Il est préférable de connaître les informations suivantes avant de procéder aux essais de lixiviation sur des colonnes de sol:

   (1) solubilité dans l'eau [méthode d'essai A.6] (13);

   (2) solubilité dans les solvants organiques;

   (3) pression de vapeur [méthode d'essai A.4] (13) et constante de Henry;

   (4) coefficient de partage n-octanol/eau [méthodes d'essai A.8 et A.24] (13);

   (5) coefficient d'adsorption (K_d, K_f ou K_{co}) [méthodes d'essai C.18 et/ou C.19] (13);

   (6) hydrolyse[méthode d'essai C.7] (13);

   (7) constante de dissociation (pK_a) [Ligne directrice 112 de l'OCDE] (25);

   (8) transformation aérobie et anaérobie dans le sol [méthode d'essai C.23] (13);

   Remarque: la température à laquelle ces mesures ont été effectuées doit être mentionnée dans les rapports d'essai respectifs.

10. Il convient d'appliquer suffisamment de substance chimique d'essai sur les colonnes de sol pour pouvoir détecter au moins 0,5 % de la dose appliquée dans n'importe quel segment. S'agissant des substances chimiques actives des produits phytosanitaires, la quantité de substance d'essai appliquée doit correspondre à la dose maximale recommandée (application unique).

11. Il faut disposer d'une méthode analytique dont l'exactitude, la précision et la sensibilité sont connues pour quantifier la substance chimique d'essai et, le cas échéant, ses produits de transformation dans le sol et le lixiviat. Il faut également connaître le seuil de détection de la méthode d'analyse pour la substance d'essai et ses produits de transformation importants (normalement au moins tous les produits de transformation dont la concentration est $\geq$ 10 % de la dose appliquée, observés dans les études du chemin réactionnel, mais de préférence tous les produits de transformation présentant un intérêt) (voir paragraphe 17).

▼M6

SUBSTANCES CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE

12. Il y a lieu d'employer des substances chimiques de référence dont le comportement de lixiviation est connu, tels que l'atrazine ou le monuron, qui peuvent être considérées comme des substances modérément sujettes à la lixiviation sur le terrain, pour évaluer la mobilité relative de la substance chimique d'essai dans le sol (1)(8)(11). Il pourrait également être utile d'utiliser une substance de référence polaire, non dégradable et non sorbante (tritium, bromure, fluorescéine, éosine, par exemple), pour suivre le mouvement de l'eau dans la colonne, afin de confirmer les propriétés hydrodynamiques de la colonne de sol.

13. Des substances analytiques étalon pourraient aussi être utiles pour caractériser et/ou identifier les produits de transformation mis en évidence dans les segments de sol et dans les lixiviats, par chromatographie, spectroscopie ou par d'autres méthodes adéquates.

DÉFINITIONS ET UNITÉS

14. Voir l'Appendice 1.

CRITÈRES DE QUALITÉ

Récupération

15. La récupération à l'issue d'un essai de lixiviation équivaut à la somme des pourcentages de la substance chimique d'essai relevés après lixiviation dans les segments de sol et dans le lixiviat de la colonne. Le taux de récupération devrait varier entre 90 % et 110 % pour les substances chimiques radiomarquées (11) et entre 70 % et 110 % pour les substances chimiques non marquées (8).

Répétabilité et sensibilité de la méthode analytique

16. La répétabilité de la méthode d'analyse pour ce qui est de quantifier la substance chimique d'essai et les produits de transformation peut être vérifiée par une double analyse du même extrait d'un segment de sol ou du lixiviat (voir paragraphe 11).

17. Le seuil de détection de la méthode d'analyse pour la substance chimique d'essai et les produits de transformation devrait atteindre au moins 0,01 mg $\cdot$ kg^{-1} dans chaque segment de sol ou dans le lixiviat (en substance chimique d'essai) ou 0,5 % de la dose appliquée dans n'importe quel segment, selon celui des deux seuils qui est le plus bas. Le seuil de quantification doit aussi être spécifié.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE EXPÉRIMENTALE

Système expérimental

18. Pour l'essai, les colonnes de lixiviation (sectionnables ou non) se composent d'un matériau suffisamment inerte (verre, acier inoxydable, aluminium, Téflon, PVC, etc.,), présentent un diamètre interne d'au moins 4 cm et mesurent au moins 35 cm de haut. On s'assurera que la substance chimique d'essai et/ou ses produits de transformation n'interagissent pas avec les matériaux de la colonne. L'Appendice 2 donne des exemples de colonnes sectionnables et non sectionnables appropriées.

19. Le remplissage et le tassement du sol dans les colonnes requièrent une cuillère, un piston et un appareil à vibrations.

20. L'arrosage des colonnes de sol par la pluie artificielle peut s'effectuer à l'aide d'un piston, d'une pompe péristaltique, de pommes de douche, de flacons de Mariotte ou d'un simple entonnoir stilligoutte.

▼M6

Matériel de laboratoire et produits

21. Cet essai nécessite du matériel courant de laboratoire, et en particulier:

(1) instruments d'analyse, tels que ceux permettant d'effectuer une chromatographie gaz-liquide, une chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) ou une chromatographie en couche mince, couplés à des systèmes de détection appropriés pour analyser les substances chimiques marquées ou non, ou une méthode de dilution isotopique inverse;

(2) instruments d'identification (par exemple par spectrométrie de masse, spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse, spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide à haute performance, résonance magnétique nucléaire, etc.);

(3) compteur à scintillation liquide pour la substance chimique d'essai radiomarquée;

(4) dispositif d'oxydation pour la combustion des substances chimiques marquées;

(5) appareil d'extraction (par exemple: tubes à centrifuger pour l'extraction à froid et appareil à reflux de Soxhlet pour l'extraction continue);

(6) appareils pour concentrer les solutions et les extraits (par exemple, évaporateur rotatif).

22. Les substances chimiques utilisées incluent des solvants organiques de qualité pour analyse, tels que l'acétone, le méthanol, etc.; compteur à scintillation liquide; une solution 0,01 M de $CaCl_2$ dans de l'eau distillée ou désionisée (= pluie artificielle).

Substance chimique d'essai

23. Pour appliquer la substance chimique d'essai sur la colonne de sol, il faut la dissoudre dans de l'eau (désionisée ou distillée). Si la substance d'essai est peu soluble dans l'eau, elle peut être appliquée sous forme de préparation (si nécessaire, après suspension ou émulsion dans l'eau) ou dans un solvant organique quelconque. Le cas échéant, le volume du solvant organique sera réduit au minimum et devra être évaporé de la surface de la colonne de sol avant le début de la lixiviation. Les préparations solides, telles que les granulés, sont à appliquer à l'état solide sans eau; pour que la substance se répartisse mieux à la surface de la colonne de sol, la préparation peut être mélangée à une petite quantité de sable quartzique (1 g, par exemple), avant d'être appliquée.

24. Il convient d'appliquer suffisamment de substance chimique d'essai sur les colonnes de sol pour pouvoir détecter au moins 0,5 % de la dose appliquée dans n'importe quel segment. Dans le cas des substances actives des produits phytosanitaires, la quantité de substance d'essai peut correspondre à la dose maximale recommandée (application unique) et, qu'il s'agisse du composé parent ou des résidus «âgés», elle doit être proportionnelle à la superficie de la colonne de sol utilisée [1].

Substance chimique de référence

25. Les essais de lixiviation devraient comporter une substance chimique de référence (voir paragraphe 12). Elle devrait être appliquée sur la colonne de sol de la même manière que la substance d'essai et à une dose permettant

[1] La quantité à appliquer dans la colonne de sol cylindrique peut être calculée à l'aide de la formule suivante:

$$M\,[\mu g] = \frac{A\,[kg/ha] \cdot 10^9[\mu g/kg] \cdot d^2[cm^2] \cdot \pi}{10^8[cm^2/ha] \cdot 4}$$

où:

M = quantité appliquée par colonne [µg]

A = densité d'application [$kg \cdot ha^{-1}$]

d = diamètre de la colonne de sol [cm]

π = 3,14

▼M6

de la détecter correctement, soit comme étalon interne appliqué avec la substance d'essai dans la même colonne, soit isolément dans une colonne de sol séparée. Il est préférable d'appliquer les deux substances chimiques sur la même colonne, sauf si les deux substances sont marquées de la même façon.

Sols

Sélection des sols

26. Pour les études de lixiviation conduites sur le composé parent, il convient d'utiliser 3 à 4 sols différant par le pH, la teneur en carbone organique et la texture (12). Le tableau 1 ci-dessous fournit des orientations quant à la sélection des sols destinés aux essais de lixiviation. Si la substance chimique d'essai est ionisable, on sélectionne des sols couvrant une vaste gamme de pH, de façon à pouvoir évaluer la mobilité de la substance sous ses formes ionisée et non ionisée; au moins 3 sols doivent avoir un pH auquel la substance d'essai se trouve à l'état mobile.

Tableau 1

Orientations pour la sélection des sols destinés aux études de lixiviation

Sol nº	pH	Carbone organique %	Teneur en argile %	Texture (*)
1	> 7,5	3,5 - 5,0	20 - 40	Terre franche argileuse
2	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15 - 25	Terre franche limoneuse
3	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15 - 30	Terre franche
4	< 4,0 - 6,0 §	< 0,5 - 1,5 § ‡	< 10 - 15 §	Sable gras
5	< 4,5	> 10 #	< 10	Sable gras/sable

(*) D'après les systèmes de la FAO et du Département de l'agriculture des États-Unis (14)

§ Les variables respectives doivent, de préférence, se situer dans la gamme indiquée. Toutefois, s'il s'avère difficile de trouver le sol adéquat, des valeurs inférieures au minimum spécifié sont acceptées.

‡ Les sols renfermant moins de 0,3 % de carbone organique risquent de perturber la corrélation entre la teneur en matière organique et l'adsorption. C'est pourquoi on recommande d'utiliser des sols renfermant au moins 0,3 % de carbone organique.

Les sols à teneur très élevée en carbone (>10 %, par exemple) risquent d'être refusés dans le contexte réglementaire (pour l'homologation des pesticides, par exemple).

27. Il peut parfois s'avérer nécessaire d'utiliser d'autres types de sol pour représenter les régions plus froides, tempérées et tropicales. Aussi, si l'on opte pour d'autres types de sols, ceux-ci devront être caractérisés par les mêmes paramètres et la même variation de propriétés que les sols décrits dans les orientations pour la sélection des sols destinés aux études de lixiviation (voir Tableau 1 ci-dessus), même s'ils ne satisfont pas exactement aux critères.

28. Les études de lixiviation sur des résidus de sol incubé sont menées sur un seul sol (12). Ce dernier doit avoir une proportion de sable >70 % et une teneur en carbone organique comprise entre 0,5 % et 1,5 % (par exemple le sol nº 4 du Tableau 1). L'utilisation de davantage de types de sols peut être nécessaire si les données sur les produits de transformation sont importantes.

29. Tous les sols doivent être caractérisés, au moins quant à la texture [% de sable, % de limon, % d'argile, selon les systèmes de classification de la FAO et du Département de l'agriculture des États-Unis],au pH, à la capacité d'échange cationique, à la teneur en carbone organique, à la densité en vrac (pour les sols dérangés) et à la capacité de rétention d'eau. La mesure

▼M6

de la biomasse microbienne n'est requise que pour le sol utilisé durant la période d'incubation/vieillissement précédant l'essai sur des résidus de sol incubé. Des informations supplémentaires sur les propriétés du sol (classification du sol, minéralogie de l'argile, superficie spécifique, par exemple) peuvent être utiles à l'interprétation des résultats de cette étude. S'agissant de déterminer les caractéristiques du sol, les méthodes recommandées dans les références peuvent être appliquées.

Collecte et stockage des sols

30. Les sols doivent être prélevés dans la couche superficielle (horizon A) jusqu'à une profondeur maximale de 20 cm et nettoyés de tous leurs résidus de végétation, de macrofaune et de pierres. Les sols (à l'exception des sols utilisés pour incuber la substance chimique d'essai) sont séchés à l'air, à température ambiante (de préférence entre 20 °C et 25 °C). La désagrégation s'effectue avec une force minime, de façon à dénaturer le moins possible la texture originale du sol. Les sols sont passés au travers d'un tamis pourvu de mailles ≤ 2 mm. Il est recommandé de les homogénéiser soigneusement, afin d'accroître la reproductibilité des résultats. Avant leur utilisation, les sols peuvent être entreposés à température ambiante et conservés séchés (à l'air) (12). Aucune durée limite de stockage n'est recommandée, mais il faudrait vérifier à nouveau la teneur en carbone organique et le pH des sols entreposés depuis plus de trois ans, avant de les utiliser.

31. L'historique des sites extérieurs où les sols d'essai ont été collectés devrait être connu en détail. Ces détails incluent la localisation exacte [définie exactement par la projection MTU (Mercator Transverse Universel/Données Horizontales Européennes) ou par ses coordonnées géographiques], le couvert végétal, les traitements par des produits phytosanitaires, les traitements avec des engrais minéraux et organiques, les ajouts de matières biologiques ou toute contamination accidentelle (12). Les sols traités avec la substance chimique d'essai ou ses analogues de structure au cours des quatre dernières années ne peuvent servir aux études de lixiviation.

Conditions expérimentales

32. Durant l'essai, les colonnes de sol destinées à la lixiviation doivent être gardées à l'obscurité et à température ambiante, à condition qu'il soit possible de limiter la variation de cette température à ± 2 °C. Les températures recommandées se situent entre 18 °C et 25 °C.

33. La pluie artificielle ($CaCl_2$ 0,01 M) est appliquée en continu à la surface des colonnes de sol, à raison de 200 mm par période de 48 heures ([1]); cette valeur s'obtient par l'application de 251 ml sur une colonne dont le diamètre intérieur mesure 4 cm. Si la finalité de l'essai l'exige, d'autres volumes de pluie artificielle déversés sur des périodes plus longues pourront être appliqués en plus.

Réalisation de l'essai

Lixiviation de la substance chimique d'essai parente

34. Au moins deux colonnes de lixiviation sont remplies avec un sol non traité, séché à l'air et tamisé (< 2 mm), jusqu'à une hauteur d'environ 30 cm. Pour que le sol soit homogène dans les colonnes, il y est introduit par petites quantités à la cuillère, puis pressé par un piston tout en soumettant simultanément la colonne à de petites vibrations, jusqu'à ce que le sommet de la colonne du sol ne s'enfonce plus. La reproductibilité des résultats obtenus

([1]) Cette valeur correspond à une pluviométrie très élevée. En Europe centrale, par exemple, la pluviométrie annuelle moyenne se chiffre à quelque 800-1 000 mm.

▼M6

avec les colonnes de lixiviation est subordonnée à la répartition uniforme du sol dans les colonnes. Les références (20)(21) et (22) fournissent des détails sur les techniques de remplissage des colonnes. Afin de contrôler la reproductibilité du procédé de remplissage, on détermine le poids total du sol tassé dans les colonnes ([1]): les poids des colonnes destinées à une expérience identique doivent être similaires.

35. Une fois remplies, les colonnes de sol sont préalablement mouillées avec la pluie artificielle ($CaCl_2$ à 0,01 M), de bas en haut, de façon que l'eau chasse l'air retenu dans les pores du sol. Après quoi, on laisse les colonnes s'équilibrer et l'excès d'eau s'égoutter par gravité. La référence (23) présente diverses méthodes de saturation des colonnes.

36. Ensuite, la substance chimique d'essai et/ou la substance chimique de référence sont appliquées sur les colonnes de sol (voir aussi les paragraphes 23-25). Pour obtenir une répartition homogène, les solutions, suspensions ou émulsions de la substance chimique d'essai et/ou de référence sont appliquées uniformément à la surface des colonnes de sol. Si le mode d'application recommandé pour la substance chimique d'essai est l'incorporation dans le sol, la substance doit être mélangée à un petit volume de sol (20 g, par exemple) et ajoutée à la surface de la colonne de sol.

37. On couvre ensuite les surfaces des colonnes de sol avec un disque en verre fritté, des perles de verre, un filtre en fibre de verre ou un papier filtre rond, afin que la pluie artificielle se répartisse uniformément sur toute la surface et d'éviter que les gouttes de pluie ne dérangent la surface du sol. L'arrosage des colonnes de sol par la pluie artificielle sera effectué avec d'autant plus de soin que le diamètre de ces colonnes est grand, de manière à ce que la pluie artificielle se répartisse uniformément à la surface du sol. Après quoi, la pluie artificielle est déversée goutte à goutte sur les colonnes de sol, à l'aide d'un piston ou d'une pompe péristaltique ou d'un entonnoir stilligoutte. Il est préférable de recueillir les lixiviats par fractions et de noter leurs volumes respectifs ([2]).

38. À la fin de la lixiviation, on laisse les colonnes de sol s'égoutter avant de les sectionner en un nombre approprié de segments, selon les renseignements à tirer de l'étude. La substance d'essai est extraite à l'aide d'un solvant approprié ou d'un mélange de solvants, puis analysée, de même que, le cas échéant, les produits de transformation, la radioactivité totale et la substance de référence. Les mêmes produits sont analysés directement,ou après extraction, dans les lixiviats ou les fractions de lixiviats. Si la substance chimique d'essai est radiomarquée, toutes les fractions renfermant au moins 10 % de la radioactivité appliquée doivent être identifiées.

Lixiviation des résidus de sol incubé

39. Un sol frais (non séché préalablement à l'air) est traité avec la substance chimique d'essai radiomarquée à une dose proportionnelle à la superficie des colonnes de sol (voir paragraphe 24) et incubé en aérobiose conformément à la méthode d'essai C.23 (13). La période d'incubation (vieillissement) doit

([1]) Voici quelques exemples de densités en vrac pour des sols dérangés: sol sableux:sol sableux: 1,66 $g \cdot ml^{-1}$
sol à sable gras: 1,58 $g \cdot ml^{-1}$
terre franche: 1,17 $g \cdot ml^{-1}$
sol limoneux: 1,11 $g \cdot ml^{-1}$

([2]) Le volume des lixiviats atteint généralement 230 à 260 ml, soit environ 92-104 % du volume total de pluie artificielle versé (251 ml), avec des colonnes de sol de 4 cm de diamètre et de 30 cm de hauteur.

▼M6

être suffisamment longue pour autoriser la formation d'une quantité appréciable de produits de transformation; on recommande une période d'incubation équivalente à la demi-vie de la substance chimique d'essai ([1]), mais cette période ne doit pas dépasser 120 jours. Avant la lixiviation, la substance chimique d'essai et ses produits de transformation présents dans le sol incubé sont analysés.

40. Les colonnes de lixiviation sont remplies jusqu'à une hauteur de 28 cm avec le même sol (mais séché à l'air) que celui utilisé pour l'incubation du sol, conformément aux instructions du paragraphe 34 et le poids total des colonnes de sol remplies est également déterminé. Les colonnes de sol sont ensuite mouillées préalablement, comme décrit au paragraphe 35.

41. Puis, la substance chimique d'essai et ses produits de transformation sont appliqués à la surface des colonnes de sol sous la forme de résidus du sol incubé (voir paragraphe 39) en un segment de sol de 2 cm de haut. Il est préférable que la hauteur totale des colonnes de sol (sol non traité + sol incubé) n'excède pas 30 cm (voir paragraphe 34).

42. La lixiviation est conduite selon les instructions données au paragraphe 37.

43. Après la lixiviation, la substance chimique d'essai, ses produits de transformation et la radioactivité non extraite sont analysés dans les segments de sol et les lixiviats, comme indiqué au paragraphe 38. Afin de déterminer la proportion de résidus de sol incubé restant dans la couche supérieure de 2 cm après lixiviation, on doit analyser ce segment séparément.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

44. Les quantités de substance chimique d'essai, de produits de transformation, de fractions non extractibles et, le cas échéant, de la substance chimique de référence, doivent être établies en pourcentage de la dose initiale appliquée, pour chaque segment de sol et fraction de lixiviat. Pour chaque colonne, on tracera une représentation graphique des pourcentages en fonction des profondeurs de sol.

45. Lorsque ces études de lixiviation sur colonne incluent une substance chimique de référence, la lixiviation d'une substance chimique peut être évaluée sur une échelle relative, à l'aide des facteurs de mobilité relative (FMR; voir la définition à l'Appendice 3) (1)(11), ce qui permet de comparer les résultats de la lixiviation de différentes substances chimiques dans différents types de sols. L'Appendice 3 fournit des exemples de valeurs de FMR pour différents produits phytosanitaires.

46. Les estimations du K_{co} (coefficient d'adsorption normalisé du carbone organique) et du K_{mo} (coefficient de répartition normalisé de la matière organique) peuvent aussi être déduites des résultats de la lixiviation sur colonne, d'après la distance moyenne de lixiviation ou les corrélations établies entre le FMR et K_{mo} ou K_{co} respectivement (4), ou par l'application d'une théorie chromatographique simple (24). Toutefois, la dernière méthode doit être utilisée avec prudence, surtout si l'on considère que le processus de lixiviation n'obéit pas entièrement à un régime d'écoulement saturé, mais plutôt à un régime non saturé.

([1]) Plus d'un produit de transformation important est susceptible de se former dans le sol et ces produits peuvent aussi apparaître à différents moments de l'étude de transformation. Dans ce cas, il peut être nécessaire de conduire des études de lixiviation sur des résidus incubés d'âges différents.

▼M6

Interprétation des résultats

47. Les études de lixiviation sur colonne décrites dans la présente méthode permettent de déterminer le potentiel de lixiviation ou de mobilité de la substance chimique d'essai dans le sol (dans l'étude de lixiviation sur le composé parent) et/ou de ses produits de transformation (dans l'étude de lixiviation sur les résidus de sol incubé). Ces essais ne permettent pas de quantifier la lixiviation des substances chimiques d'essai sur le terrain, mais peuvent être utilisés pour comparer la lixiviabilité d'une substance chimique avec d'autres dont le comportement de lixiviation est connu (24). De la même manière, ces essais ne mesurent pas quantitativement le pourcentage de substance chimique appliquée susceptible d'atteindre les eaux souterraines (11). Néanmoins, les résultats des études de lixiviation sur colonne peuvent orienter la décision de conduire ou non des essais supplémentaires sur le terrain ou en partie sur le terrain pour les substances qui présentent un potentiel de mobilité élevé lors des essais en laboratoire.

Rapport d'essai

48. Le rapport d'essai doit inclure les informations suivantes:

Substance chimique d'essai et substance chimique de référence (le cas échéant):

— nom courant, nom chimique (nomenclature IUPAC et CAS), numéro CAS, structure chimique (indiquant la position du marqueur si une substance radiomarquée est utilisée) et propriétés physico-chimiques pertinentes;

— pureté (impuretés) de la substance chimique d'essai;

— pureté radiochimique de la substance chimique marquée et activité spécifique, le cas échéant.

Sols d'essai:

— détails relatifs au site de prélèvement;

— propriétés des sols, telles que le pH, la teneur en carbone organique et en argile, la texture et la densité en vrac (pour les sols dérangés);

— activité microbienne du sol (seulement pour le sol utilisé pour incuber/vieillir la substance chimique d'essai);

— durée et conditions du stockage du sol.

Conditions expérimentales:

— dates de la réalisation des études;

— longueur et diamètre des colonnes de lixiviation;

— poids total du sol contenu dans les colonnes de sol;

— quantité de substance chimique d'essai et, s'il y a lieu, de substance chimique de référence appliquée;

— volume, fréquence et durée de l'application de la pluie artificielle;

— température du dispositif expérimental;

— nombre d'expériences identiques (au moins deux);

— méthodes d'analyse de la substance chimique d'essai, des produits de transformation et, le cas échéant, de la substance chimique de référence dans les différents segments de sol et les lixiviats;

— méthodes de caractérisation et d'identification des produits de transformation dans les segments de sol et les lixiviats.

▼**M6**

Résultats de l'essai:

— tableaux de résultats exprimés en concentrations et en % de la dose appliquée pour les segments de sol et les lixiviats;

— bilan massique, s'il y a lieu;

— volumes des lixiviats;

— distances de lixiviation et, s'il y a lieu, facteurs de mobilité relative;

— tracé du % détecté dans les segments de sol en fonction de la profondeur des segments de sol;

— analyse et interprétation des résultats.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Guth, J.A., Burkhard, N. and Eberle, D.O. (1976). Experimental models for studying the persistence of pesticides in soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.

(2) Russel, M.H. (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals — T.R. Roberts and P.C. Kearney, Eds.). J. Wiley & Sons.

(3) Briggs, G.G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem. 29, 1050-1059.

(4) Chiou, C.T., Porter, P.E. and Schmedding, D.W. (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227-231.

(5) Guth, J.A. (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26-33.

(6) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(7) Agriculture Canada (1987). Guide d'homologation des pesticides au Canada: chimie et devenir dans l'environnement.

(8) Annexe I de la directive 95/36/CE de la Commission, du 14 juillet 1995, modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques, JO L 172 du 22.7.1995, p.8.

(9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.

(11) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(12) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy 18-20 January 1995.

(13) Chapitres suivants de la présente annexe:

Chapitre A.4, pression de vapeur

Chapitre A.6, solubilité dans l'eau

▼**M6**

Chapitre A.8, coefficient de partage, méthode par agitation en flacon

Chapitre A.24, coefficient de partage, méthode HPLC

Chapitre C.7, dégradation — dégradation abiotique: hydrolyse en fonction du pH

Chapitre C.18, détermination de l'adsorption/désorption au moyen de la méthode par agitation

Chapitre C.23, transformation aérobie et anaérobie dans le sol

(14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 305 (1962).

(15) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, Ed.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

(16) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

(17) Compendium de normes ISO Environnement (1994). Qualité du sol — Aspects généraux; méthodes d'analyse chimiques et physiques; méthodes d'analyse biologiques. Première édition.

(18) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen un petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.

(19) Scheffer, F. and Schachtschabel, P. (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(20) Weber, J.B. and Peeper, T.F. (1977). In Research Methods in Weed Science, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73-78.

(21) Weber, J.B., Swain, L.R., Strek, H.J. and Sartori, J.L. (1986). In Research Methods in Weed Science, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190-200.

(22) Oliveira et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 60 (1). 49-53.

(23) Shackelford, C.D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. — A review. J. Contam. Hydrol. 7, 177-217.

(24) Hamaker, J.W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V.H. Freed, Eds.), 115-133. Plenum Press, New York

(25) OCDE (1981). Constantes de dissociation dans l'eau. Ligne directrice n° 112 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris

▼**M6**

Appendice 1

Définitions et unités

Résidus de sol incubé (ou résidus «âgés»): substance chimique d'essai et produits de transformation présents dans le sol au terme d'une période suffisamment longue après l'application pour permettre aux processus de transport, d'adsorption, métaboliques et dissipatifs de modifier la répartition et la nature chimique d'une partie de la substance chimique appliquée (1).

Pluie artificielle: solution de $CaCl_2$ à 0,01 M dans de l'eau distillée ou désionisée.

Distance moyenne de lixiviation: fond d'une section de sol où les différentes fractions de substance chimique récupérées jusque-là totalisent 50 % de la substance chimique d'essai récupérée totale [essai de lixiviation normal], ou (fond d'une section de sol où les différentes fractions de substance chimique récupérées jusque-là totalisent 50 % de la substance chimique d'essai récupérée totale) — [(épaisseur de la couche de sol incubé)/2] [essai de lixiviation des résidus de sol incubé].

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Lixiviat: phase aqueuse ayant percolé à travers un profil de sol ou une colonne de sol (1).

Lixiviation: processus par lequel une substance chimique migre vers le bas à travers un profil de sol ou une colonne de sol (1).

Distance de lixiviation: distance du segment de sol le plus profond dans lequel on retrouve au moins 0,5 % de la substance chimique d'essai appliquée ou du résidu de sol incubé, après la lixiviation (équivaut à la profondeur de pénétration).

Seuil de détection et **seuil de quantification**: le seuil de détection est la concentration d'une substance chimique en dessous de laquelle il n'est plus possible de distinguer l'identité de la substance des artéfacts de la technique d'analyse. Le seuil de quantification est la concentration d'une substance en dessous de laquelle la concentration ne peut être déterminée avec une précision acceptable.

Facteur de mobilité relative (FMR): [distance de lixiviation de la substance d'essai (cm)]/[distance de lixiviation de la substance de référence (cm)].

Substance chimique **d'essai**: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Produit de transformation: toutes les substances engendrées par des réactions de transformation biotiques ou abiotiques de la substance d'essai, y compris le CO_2 et les produits liés aux résidus.

Sol: mélange de composants chimiques minéraux et organiques, ces derniers contenant des composés fortement carbonacés et azotés et de poids moléculaire élevé, peuplés de petits organismes (surtout des microorganismes). Le sol peut être mis à l'essai sous deux états:

— non dérangé, tel qu'il s'est constitué au fil du temps, avec des couches caractéristiques de divers types de sols;

— dérangé, comme on le trouve généralement dans les champs cultivés ou du fait que des échantillons y ont été prélevés par creusement et utilisés dans la présente méthode d'essai.

(1) Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Weeds 68, 1167-1193.

(2) Ligne directrice de l'OCDE n° 304A: Biodégradabilité intrinsèque dans le sol (adoptée le 12 mai 1981).

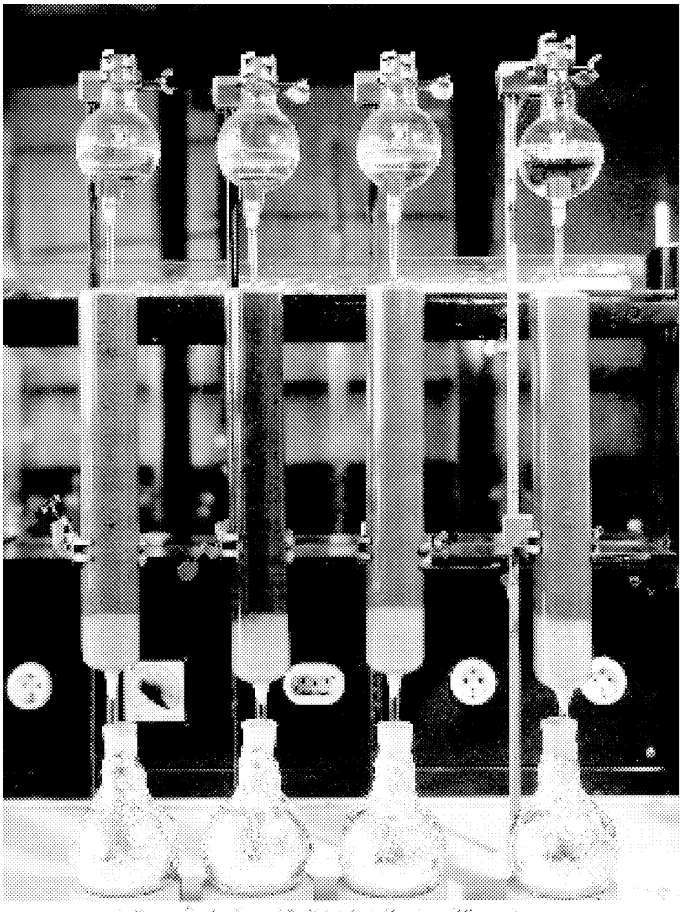
▼M6

Appendice 2

Figure 1

Exemple de colonnes de lixiviation en verre non sectionnables, de 35 cm de longueur et d'un diamètre interne de 5 cm (1)

(1)



← Entonnoirs stilligouttes pour l'application de la pluie artificielle

← Disque en verre fritté pour protéger la surface du sol des dérangements et assurer une répartition uniforme de la pluie artificielle.

← Colonne en verre remplie de sol d'essai (si la substance d'essai est photolabile, la colonne devra être emballée dans du papier aluminium)

← Couche de sable quartzique

← Tampon de laine de verre pour retenir le sol dans la colonne

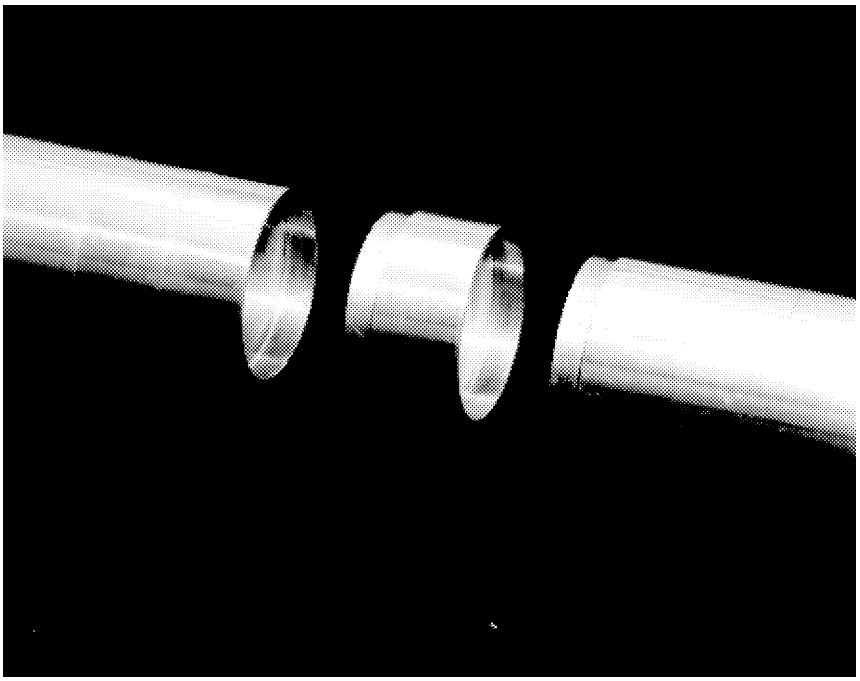
← Ballon destiné à recueillir le lixiviat, emballé dans du papier aluminium afin d'empêcher la photolyse.

Drescher, N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden — 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225-236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.
Figure 2

▼**M6**

Exemple de colonne sectionnable en métal de 4 cm de diamètre intérieur (1)

(1)



Burkhard, N., Eberle, D.O. and Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides.
Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203-213.

▼**M6**

Appendice 3

Exemples de facteurs de mobilité relative (*) (FMR) de différents produits phytosanitaires (1)(2) et classes de mobilité correspondantes (+)

Gamme de FMR	Substance chimique (FMR)	Classe de mobilité
≤ 0,15	Parathion (< 0,15), Flurodifen (0,15)	I immobile
0,15 - 0,8	Profenophos (0,18), Propiconazole (0,23), Diazinon (0,28), Diuron (0,38), Terbutylazine (0,52), Methidathion (0,56), Prometryn (0,59), Propazine (0,64), Alachlor (0,66), Metolachlor (0,68)	II légèrement mobile
0,8 - 1,3	Monuron (**) (1,00), Atrazine (1,03), Simazine (1,04), Fluometuron (1,18)	III modérément mobile
1,3 - 2,5	Prometon (1,67), Cyanazine (1,85), Bromacil (1,91), Karbutilate (1,98)	IV assez mobile
2,5 - 5,0	Carbofuran (3,00), Dioxacarb (4,33)	V mobile
> 5,0	Monocrotophos (> 5,0), Dicrotophos (> 5,0)	VI très mobile

(*) Le facteur de mobilité relative se calcule comme suit (3):

$$\text{RMF} = \frac{\text{distance de lixiviation de la substance chimique d'essai (cm)}}{\text{distance de lixiviation de la substance chimique de référence (cm)}}$$

(**) Substance chimique de référence

\+ D'autres systèmes de classement de la mobilité d'une substance chimique dans le sol s'appuient sur les valeurs de R_f de chromatographie en couche mince (4) et du K_{co} (5)(6).

(1) Guth, J.A. (1985). Adsorption/desorption In Joint International Symposium «Physicochemical Properties and their role in Environmental Hazard Assessment». Canterbury, UK, 1-3 July 1985.

(2) Guth, J.A. and Hörmann, W.D. (1987). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr. Reihe Verein WaBoLu, 68, 91-106.

(3) Harris, C.I. (1967). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, 214-216.

(4) Helling, C.S. (1971). Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35, 743-748.

(5) McCall, P.J., Laskowski, D.A., Swann, R.L. and Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.

(6) Hollis, J.M. (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water, 165-174.

▼M6

C.45. ESTIMATION DES ÉMISSIONS ISSUES DE BOIS TRAITÉ PAR UN PRODUIT DE PRÉSERVATION DANS L'ENVIRONNEMENT: MÉTHODE DE LABORATOIRE APPLICABLE AUX ARTICLES EN BOIS SANS REVÊTEMENT QUI SONT EN CONTACT AVEC DE L'EAU DOUCE OU DE L'EAU DE MER.

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 313 (2007) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les émissions dans l'environnement issues de bois traité par un produit de préservation doivent être quantifiées pour permettre une évaluation des risques pour l'environnement engendrés par le bois traité. La présente méthode d'essai décrit une méthode de laboratoire permettant d'estimer les émissions issues de bois traité par des produits de préservation dans deux cas possible d'émission dans l'environnement:

   — Les émissions issues de bois traité en contact avec de l'eau douce. Les émissions provenant de la surface du bois traité pourraient pénétrer dans l'eau.

   — Les émissions issues de bois traité en contact avec de l'eau de mer. Les émissions provenant de la surface du bois traité pourraient pénétrer dans l'eau de mer.

2. La présente méthode d'essai a pour objet l'analyse des émissions issues du bois et des articles en bois sans revêtement qui sont en contact avec de l'eau douce ou de l'eau de mer. Les classes d'emploi, utilisées au niveau international, déterminent les catégories de dangers biologiques auxquels sont exposés les articles traités. Les classes d'emploi définissent également les cas dans lesquels l'article traité est utilisé et délimitent les compartiments environnementaux (air, eau, sol) exposés à un risque du fait du bois traité par un produit de préservation.

3. La méthode d'essai est un protocole de laboratoire permettant d'obtenir des échantillons (milieu d'émission) dans l'eau utilisée pour immerger un bois traité, après des délais croissants d'exposition. La quantité d'émissions dans le milieu d'émission est corrélée à la surface spécifique du bois et à la durée de l'exposition, afin d'estimer un flux en mg/m^2/jour. Le flux (taux de délavage) après des périodes d'exposition de plus en plus longues peut ainsi être estimé.

4. La quantité d'émissions peut être utilisée dans une évaluation des risques environnementaux engendrés par le bois traité.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

5. Il est vraisemblable que le mécanisme de délavage de la surface du bois par l'eau douce n'est pas de nature ni d'intensité identiques au délavage d'une surface de bois par de l'eau de mer. Par conséquent, il est nécessaire d'entreprendre une étude du délavage du bois par l'eau de mer applicable aux produits ou aux mélanges de préservation utilisés pour traiter le bois employé dans un environnement d'eau salée.

6. Dans une étude de traitement par un produit de préservation du bois, le bois doit être représentatif des matériaux utilisés dans le commerce. Il doit être traité conformément aux instructions du fabricant du produit de préservation et dans l'observation des normes et spécifications appropriées. Les paramètres du conditionnement postérieur au traitement du bois et préalables à l'essai doivent être spécifiés.

7. Les échantillons de bois employés doivent correspondre aux produits utilisés (par exemple en termes d'espèce, de densité et d'autres caractéristiques).

▼M6

8. L'essai peut être appliqué au bois par un procédé de pénétration ou par application superficielle ou à un bois traité soumis ensuite à un traitement de surface imposé complémentaire (par exemple une peinture dont l'application est exigée pour un usage commercial).

9. La composition, la quantité, le pH et l'état physique de l'eau sont des facteurs qui conditionnent la détermination de la quantité, de la teneur et de la nature des émissions issues du bois.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

10. Les échantillons expérimentaux de bois traités par un produit de préservation sont immergés dans de l'eau. L'eau (milieu d'émission) est recueillie et soumise à une analyse chimique répétée à plusieurs reprises au cours de la période d'exposition, de façon à permettre l'analyse statistique. Les taux d'émission en mg/m^2/jour sont calculés à partir des résultats analytiques. Les périodes de prélèvement des échantillons doivent être notées. Il est possible d'interrompre les essais sur échantillons non traités si aucune valeur de base n'a été détectée sur les trois premiers points de résultats.

11. L'inclusion dans l'étude d'échantillons de bois non traités permet la détermination des niveaux de base des produits émis par le bois autres que le produit de préservation utilisé.

CRITÈRES DE QUALITÉ

Exactitude

12. L'exactitude de la méthode d'estimation des émissions dépend de la représentativité des échantillons expérimentaux par rapport au bois traité du commerce, de la représentativité de l'eau par rapport à de l'eau réelle et de la représentativité du régime d'exposition par rapport aux conditions naturelles.

13. L'exactitude, la précision et la répétabilité de la méthode analytique doivent être déterminées avant la mise en œuvre de l'essai.

Reproductibilité

14. La valeur moyenne est calculée à partir de trois échantillons d'eau prélevés et analysés et elle est considérée comme valeur d'émission. La reproductibilité des résultats au sein d'un laboratoire et entre différents laboratoires dépend du dispositif d'immersion et du bois utilisé pour les échantillons expérimentaux.

Intervalle de résultats acceptable

15. L'intervalle de résultats de cet essai est acceptable dès lors que les valeurs supérieures et inférieures diffèrent de moins d'un ordre de grandeur.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Eau

16. Modes de délavage dans l'eau douce: il est recommandé d'utiliser de l'eau désionisée (par exemple, ASTM D 1193 Type II) dans l'essai de délavage lorsque l'on cherche à évaluer un bois exposé à de l'eau douce. La température de l'eau doit se situer à 20 °C +/– 2 °C et les mesures de pH et de température de l'eau doivent être intégrées dans le rapport d'essai. L'analyse d'échantillons de l'eau employée prélevés avant immersion des échantillons traités permet d'estimer les substances chimiques étudiées dans l'eau. Il s'agit d'un témoin permettant de déterminer les valeurs de base des substances qui seront ensuite chimiquement analysées.

▼M6

17. Mode de délavage dans de l'eau de mer: Il est recommandé d'utiliser une eau de mer synthétique (par exemple, ASTM D 1141 Eau océanique substitut, sans métaux lourds) dans l'essai de délavage lorsqu'on cherche à évaluer un bois exposé à de l'eau de mer. La température de l'eau doit se situer à 20 °C +/– 2 °C et les mesures de pH et de température de l'eau doivent être intégrées dans le rapport d'essai. L'analyse d'échantillons de l'eau employée prélevés avant immersion des échantillons traités permet d'estimer les substances chimiques étudiées dans l'eau. Il s'agit là d'un témoin permettant de déterminer les valeurs de base des substances chimiques importantes.

Échantillons expérimentaux de bois

18. Pour la pleine efficacité de l'essai des produits de préservation du bois, l'espèce de bois doit être représentative des espèces habituellement utilisées. Les espèces recommandées sont *Pinus sylvestris L.* (pin sylvestre), *Pinus resinosa Ait*. (pin rouge d'Amérique), ou *Pinus spp* (pin du sud). Des tests complémentaires peuvent être effectués sur d'autres espèces.

19. Il convient d'utiliser un bois à fil droit sans nœud et d'éviter les matériaux d'apparence résineuse. Le bois doit être représentatif d'un bois disponible dans le commerce. Le bois doit être représentatif d'un bois disponible dans le commerce. La source, la densité et le nombre des cernes annuels pour 10 mm doivent être notés.

20. Il est recommandé d'utiliser les échantillons expérimentaux de bois par groupes de cinq conformément aux blocs de taille de la norme EN 113 (dimensions 25 mm × 50 mm × 15 mm) avec des faces longitudinales parallèles au fil du bois, mais on peut cependant utiliser d'autres dimensions, par exemple 50 mm sur 150 mm sur 10 mm. L'échantillon doit être complètement immergé dans l'eau. Les échantillons doivent être constitués à 100 % d'aubier. Chaque échantillon est individuellement marqué de façon à pouvoir être identifié sur toute la durée de l'essai.

21. Tous les échantillons doivent être rabotés ou sciés, sans ponçage des surfaces.

22. Les groupes d'échantillons expérimentaux de bois utilisés pour l'analyse sont au nombre d'au moins cinq: trois groupes de spécimens sont traités par le produit de préservation, un groupe n'est pas traité et un groupe est réservé à l'estimation de la teneur en humidité après séchage à l'étuve des échantillons expérimentaux avant le traitement. Le nombre d'échantillons préparés doit permettre la sélection d'au moins trois groupes d'échantillons dont la rétention du produit de préservation a une valeur égale à la moyenne, à 5 % près, de l'ensemble des échantillons expérimentaux.

23. Tous les échantillons expérimentaux sont colmatés à l'extrémité par une substance chimique qui empêche la pénétration du produit de préservation dans le fil d'extrémité ou empêche le délavage des échantillons par l'intermédiaire du fil d'extrémité. Lors de l'application de l'agent colmatant l'extrémité, il faut distinguer les échantillons recevant une application superficielle de ceux soumis à des procédés de pénétration. Cet agent ne doit être appliqué avant le traitement que dans le cas d'une application superficielle.

24. Le fil d'extrémité doit rester ouvert lors des traitements par des procédés de pénétration. Par conséquent les échantillons seront colmatés à l'extrémité après la période de conditionnement. L'émission n'est estimée que pour la surface spécifique longitudinale. Il convient d'examiner les agents colmatants et de procéder à une nouvelle application, s'il y a lieu, avant le début du délavage, mais jamais après.

▼M6

Récipient d'immersion

25. Le récipient est constitué d'un matériau inerte et ses dimensions permettent de contenir 5 échantillons de bois conformes à EN 113 dans 500 ml d'eau, le rapport surface spécifique au volume d'eau étant égal à 0,4 cm^2/ml.

Assemblage des échantillons dans l'essai

26. L'assemblage qui soutient les échantillons expérimentaux permet le contact de toutes les surfaces exposées de l'échantillon avec l'eau.

PROTOCOLE DU TRAITEMENT DE PRÉSERVATION

Préparation des échantillons expérimentaux traités

27. La méthode de traitement de l'échantillon expérimental de bois par le produit de préservation conformément à l'essai est celle spécifiée pour ce produit, c'est-à-dire un procédé de traitement de pénétration ou un procédé d'application superficielle, par exemple un trempage, une pulvérisation ou un badigeonnage.

Produits de préservation appliqués par un procédé de traitement par pénétration

28. On prépare une solution du produit de préservation qui permet l'absorption ou la rétention spécifiée lorsqu'on l'applique à l'aide du procédé du traitement par pénétration. L'échantillon expérimental de bois est pesé et ses dimensions sont mesurées. Le procédé de traitement de pénétration doit être un procédé spécifié pour l'application du produit de préservation au bois dans l'objectif d'une utilisation dans la classe d'emploi 4 ou 5. L'échantillon est à nouveau pesé après traitement et la rétention du produit de préservation (kg/m^3) est calculée par l'équation:

$$\frac{\text{Masse après traitement(kg)} - \text{Masse avant traitement(kg)}}{\text{Volume de l'echantillon expérimental}(m^3)} \times \frac{\text{Concentration de la solution(\% masse/masse)}}{100}$$

29. Il convient de noter qu'il est possible d'utiliser dans cet essai un bois d'œuvre traité dans une usine de traitement industriel \big(par exemple, par imprégnation sous vide). Les protocoles employés doivent être consignés et la rétention du matériau ainsi traité doit être analysée et enregistrée.

Produit de préservation appliqué par des procédés d'application superficielle

30. Les procédés d'application superficielle comprennent le trempage, la pulvérisation ou le badigeonnage des échantillons expérimentaux de bois. Le procédé et le taux d'application (par exemple litres/m^2) sont ceux spécifiés pour l'application superficielle du produit de préservation.

31. Il convient de noter que dans ce cas également du bois d'œuvre traité dans une usine de traitement industriel peut être utilisé dans l'essai. Les protocoles employés doivent être consignés et la rétention du matériau ainsi traité doit être analysée et enregistrée.

Conditionnement des échantillons expérimentaux après traitement

32. Après traitement, il faut conditionner les échantillons expérimentaux traités conformément aux recommandations dispensées par le fournisseur du produit de préservation de l'essai, et en respectant les conditions portées sur l'étiquette du produit ou en respectant les pratiques de traitement habituelles dans l'industrie ou selon la norme EN 252.

▼M6

Préparation et sélection des échantillons expérimentaux

33. Après le conditionnement qui suit le traitement, la rétention moyenne du groupe d'échantillons expérimentaux est calculée et trois groupes d'échantillons représentatifs dont la rétention est égale à la moyenne à 5 % près du groupe sont sélectionnés au hasard pour procéder à des mesures de délavage.

PROTOCOLE DES MESURES D'ÉMISSION DU PRODUIT DE PRÉSERVATION

Méthode par immersion

34. Les échantillons expérimentaux sont pesés et ensuite totalement immergés dans l'eau tandis que la date et l'heure sont enregistrées. Le récipient est couvert afin de réduire l'évaporation.

35. L'eau est remplacée aux intervalles suivants: 6 heures, 1 jour, 2 jours, 4 jours, 8 jours, 15 jours, 22 jours, 29 jours (note: il s'agit là de durées totales et non des intervalles entre les prélèvements). L'heure et la date du changement de l'eau et la masse d'eau recueillie dans le récipient sont consignées.

36. Chaque fois que l'eau est remplacée, un échantillon de l'eau dans laquelle a été immergé le groupe des échantillons expérimentaux est conservé à des fins d'analyses chimiques.

37. Le protocole d'échantillonnage permet le calcul d'une courbe de quantité d'émissions en fonction du temps. Il faut conserver les échantillons dans des conditions permettant de préserver l'analyte, par exemple dans un réfrigérateur à l'obscurité, afin de limiter la croissance microbienne dans l'échantillon avant son analyse.

MESURE DES ÉMISSIONS

Échantillons traités

38. La substance active et/ou ses produits de dégradation ou de transformation appropriés, s'il y a lieu, sont chimiquement analysés dans l'eau collectée.

Échantillons non traités

39. La collecte de l'eau (milieu d'émission) dans ce système et l'analyse consécutive des substances lessivées à partir d'échantillons de bois non traité permet d'estimer le taux d'émission éventuel du produit de préservation par le bois non traité. La vitesse de changement du taux d'émission en fonction du temps peut être estimée par la collecte et l'analyse du milieu d'émission après des délais croissants d'exposition. Cette analyse constitue un moyen de contrôle permettant de déterminer les niveaux de base de la substance chimique d'essai dans le bois non traité pour confirmer l'absence de traitement préalable du bois source d'échantillons par le produit de préservation.

RÉSULTAT ET RAPPORT

Analyses chimiques

40. L'eau collectée est chimiquement analysée et les résultats de l'analyse sont exprimés en unités appropriées, par exemple, µg/l.

Rapport des résultats

41. Tous les résultats sont enregistrés. L'appendice présente un exemple de formulaire de relevé conseillé pour un groupe d'échantillons expérimentaux traités, et le tableau de synthèse permettant le calcul des valeurs moyennes d'émissions à chaque intervalle de prélèvement.

42. Le calcul du flux d'émissions quotidiennes en mg/m^2/jour consiste à diviser la moyenne des trois mesures de trois expériences identiques par le nombre de jours d'immersion.

▼M6

Rapport de l'essai

43. Le rapport de l'essai doit contenir au moins les informations suivantes:

— Le nom du fournisseur du produit de préservation soumis à l'essai;

— Le nom ou le code spécifique et individuel du produit de préservation testé;

— Le nom commercial ou courant du ou des ingrédients actifs, assorti d'une description générique des co-formulants (par exemple, co-solvant, résine) et la composition en % m/m des ingrédients;

— La valeur pertinente de rétention ou de charge (en kg/m^3 ou l/m^2, respectivement) spécifiée pour le bois employé au contact de l'eau;

— L'espèce de bois utilisée, caractérisée par sa densité et sa vitesse de croissance en cernes pour 10 mm;

— La charge ou la rétention du produit de préservation testé et la formule utilisée pour calculer la rétention, exprimée en l/m^2 ou kg/m^3;

— La méthode d'application du produit de préservation, précisant le mode de traitement utilisé pour un procédé par pénétration, et la méthode d'application dans le cas d'un traitement superficiel;

— La date d'application du produit de préservation ainsi qu'une estimation de la teneur en humidité des échantillons expérimentaux, exprimée en pourcentage;

— Les protocoles de conditionnement employés, détaillant le type, les conditions et la durée;

— L'indication de l'agent de colmatage d'extrémité employé et le nombre d'applications;

— La notification de tout traitement consécutif du bois, par exemple, indication du fournisseur, du type, des caractéristiques et de la charge d'une peinture;

— L'heure et la date de chaque événement d'immersion, la quantité d'eau utilisée pour l'immersion des échantillons expérimentaux lors de chacun de ces événements, et la quantité d'eau absorbée par le bois pendant l'immersion;

— Toutes les variations modifiant la méthode décrite et tous les facteurs susceptibles d'influencer les résultats.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Norme Européenne, EN 84 — 1997. Produits de préservation du bois Epreuve de vieillissement accéléré des bois traités avant essais biologiques. Epreuve de délavage.

(2) Norme Européenne, EN 113/A1 — 2004. Produits de préservation du bois. Produits de préservation du bois — Méthode d'essai pour déterminer l'efficacité protectrice vis-à-vis des champignons basidiomycètes lignivores — Détermination du seuil d'efficacité.

(3) Norme Européenne, EN 252 — 1989. Essai de champ pour déterminer l'efficacité protectrice relative d'un produit de préservation du bois en contact avec le sol.

(4) Norme Européenne, EN 335 — Partie 1: 2006. Durabilité du bois et des matériaux dérivés du bois — Définition des classes d'emploi — Partie 1: Généralités.

(5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 — 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.

(6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II — 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.

▼M6

Appendice 1

Formulaire de relevé pour la méthode d'essai

Estimation des émissions issues de bois traité par un produit de préservation dans l'environnement: méthode de laboratoire applicable aux articles en bois sans revêtement qui sont en contact avec de l'eau douce ou de l'eau de mer.

Site de l'essai	

Produit de préservation du bois

Fournisseur du produit de préservation	
Nom ou code spécifique et individuel du produit de préservation	
Nom commercial ou courant du produit de préservation	
Co-formulants	
Rétention correspondant au bois utilisé au contact de l'eau	

Application

Méthode d'application	
Date d'application	
Formule utilisée pour calculer la rétention:	
Protocole de conditionnement	
Durée du conditionnement	
Agent colmatant l'extrémité / nombre d'applications	
Traitement consécutif	s'il y a lieu

Échantillons expérimentaux

Espèce de bois	
Densité du bois	(minimum … valeur moyenne … maximum)
Vitesse de croissance (cernes pour 10 mm)	(minimum … valeur moyenne … maximum)
Teneur en humidité	

▼M6

Assemblages de l'essai (*)	**Rétention (par exemple kg/m^3)**
Traité «x»	Valeur moyenne et écart type ou intervalle pour 5 échantillons
Traité «y»	Valeur moyenne et écart type ou intervalle pour 5 échantillons
Traité «z»	Valeur moyenne et écart type ou intervalle pour 5 échantillons
Non traité	
Variation par rapport aux paramètres de la méthode d'essai	Par exemple, qualité de l'eau, dimensions des échantillons expérimentaux etc.

(*) x, y, z représentent les trois échantillons d'expériences identiques

▼M6

Durée	Echange d'eau	Masse de l'échantillon		Absorption d'eau		Echantillon d'eau				
		Traité (moyenne)	Non traité	Traité (moyenne)	Non traité		Eau de l'essai	x	y	z
	Date	g	g	g	g	n°	pH	pH	pH	pH
début										
6 h						1				
24 h						2				
2 j						3				
4 j						4				
8 j						5				
15 j						6				
22 j						7				
29 j						8				

▼M6

Préparer des tableaux séparés pour chaque ingrédient actif

Durée	Échange d'eau	Résultats analytiques															
		Échantillons non traités			Échantillons traités												
					Concentration d'i.a. dans l'eau				Quantité émise				Taux d'émission			
		Concentration d'i.a. dans l'eau mg/l	Quantité émise mg/m^2	Taux d'émission mg/m^2/j	x	y	z	Moyenne	x	y	z	Moyenne	x	y	z	Moyenne
	Date				mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2/j	mg/m^2/j	mg/m^2/j	mg/m^2/j
6 h																
24 h																
2 j																
4 j																
8 j																
15 j																
22 j																
29 j																

Note: Les résultats concernant le bois non traité peuvent être utilisés pour corriger les taux d'émission des échantillons traités, et ils doivent par conséquent apparaître en premier et toutes les valeurs des échantillons traités sont des «valeurs corrigées». L'analyse initiale de l'eau peut également donner lieu à une correction.

▼**M6**

Appendice 2

Définitions

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼M6

C.46. BIOACCUMULATION CHEZ LES OLIGOCHÈTES BENTHIQUES FOUISSEURS

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 315 (2008) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les animaux endobenthiques ingérant des sédiments peuvent être exposés aux substances liées aux sédiments (1). Parmi ces espèces ingérant des sédiments, les oligochètes aquatiques jouent un rôle important à la base des systèmes aquatiques. Ils vivent dans les sédiments et représentent souvent les espèces les plus abondantes, en particulier dans des habitats dont les conditions environnementales sont hostiles aux autres animaux. Par la bioturbation de ces sédiments et en servant de proie, ces animaux peuvent avoir une forte influence sur la biodisponibilité de ces substances pour d'autres organismes comme les poissons benthivores. Par opposition aux organismes épibenthiques, les oligochètes aquatiques endobenthiques s'enfouissent dans les sédiments et ingèrent des particules de sédiment sous la surface des sédiments. De ce fait, ces organismes sont exposés aux substances chimiques qui peuvent pénétrer dans leur corps de diverses manières comme par contact direct, ingestion de particules sédimentaires contaminées, via l'eau interstitielle et l'eau surjacente. Certaines espèces d'oligochètes benthiques actuellement utilisées dans des essais écotoxicologiques sont décrites à l'Appendice 6.

2. Les paramètres qui caractérisent la bioaccumulation d'une substance se composent essentiellement du facteur de bioaccumulation (FBA), de la constante de vitesse d'absorption sédimentaire (k_s) et de la constante de vitesse d'élimination (k_e). L'Appendice 1 donne des définitions détaillées de ces paramètres.

3. Afin d'évaluer le potentiel de bioaccumulation de substances chimiques de manière générale et d'étudier la bioaccumulation de substances ayant tendance à se répartir dans ou sur les sédiments, une méthode d'essai comportant des compartiments spécifiques est nécessaire (1) (2) (3) (4).

4. La présente méthode d'essai doit permettre d'évaluer la bioaccumulation de substances chimiques associées à des sédiments dans des vers oligochètes endobenthiques. La substance d'essai est dispersée dans le sédiment. L'utilisation d'un sédiment enrichi a pour but de simuler un sédiment contaminé.

5. La méthode se fonde sur les méthodes d'essai existantes pour la toxicité sédimentaire et la bioaccumulation (1) (4) (5) (6) (7) (8) (9). On trouvera des informations utiles dans les discussions et résultats d'un groupe de travail international (11) et les résultats d'un essai comparatif interlaboratoires international (12).

6. Cet essai s'applique aux substances chimiques organiques neutres, stables, qui ont tendance à s'associer aux sédiments. Cette méthode permet également de mesurer la bioaccumulation de composés organométalliques stables, associés à des sédiments (12). Elle ne s'applique pas aux métaux et autres éléments présents à l'état de traces (11), sans modification de la conception de l'essai en ce qui concerne les volumes de substrat et d'eau, et probablement la dimension des échantillons de tissu.

PRÉREQUIS ET INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

7. Il existe quelques relations structure-activité quantitatives (RSAQ) bien établies, disponibles, concernant les processus de bioaccumulation (14). La relation la plus largement utilisée est la corrélation entre la bioaccumulation et la bioconcentration de substances organiques stables et leur lipophilie respective (exprimée comme le logarithme du coefficient de partage octanol-eau (log K_{oe}); voir la définition en Appendice 1), qui a été développée pour la description d'une substance se répartissant entre l'eau et les poissons.

▼**M6**

Cette relation a également permis d'établir des corrélations pour le compartiment sédimentaire (15)(16)(17)(18). La corrélation log K_{oe}-log FBC, principale RSAQ, peut être utile pour une estimation préliminaire du potentiel de bioaccumulation de substances chimiques associées à un sédiment. Toutefois, le FBA peut être influencé par la teneur en lipide de l'organisme d'essai et la teneur en carbone organique du sédiment. Par conséquent, il est également possible d'utiliser le coefficient de partage carbone organique/eau (K_{co}) comme déterminant principal de la bioaccumulation de composés organiques associés à un sédiment.

8. Cet essai s'applique:

   — aux substances organiques, stables, dont les valeurs de log K_{oe} sont comprises entre 3,0 et 6,0 (5) (19) et aux substances superlipophiles dont le log K_{oe} est supérieur à 6,0 (5);

   — aux substances appartenant à la classe des substances organiques connues pour leur potentiel de bioaccumulation dans les organismes vivants, p. ex. les agents tensioactifs ou les substances fortement adsorbantes (p. ex. de K_{co} élevée).

9. Avant de débuter toute étude, il convient de se procurer certaines informations sur la substance d'essai, comme les mesures de sécurité, les conditions de stockage convenables, la stabilité et les méthodes analytiques. Des conseils pour la réalisation d'essais rendus difficiles par les propriétés physico-chimiques des substances d'essai sont donnés dans (20) et (21). Avant de conduire un essai de bioaccumulation sur des oligochètes aquatiques, il est nécessaire de réunir les informations suivantes à propos de la substance d'essai:

   — le nom courant, le nom chimique (de préférence le nom IUPAC), la formule structurale, le n°CAS, la pureté;

   — la solubilité dans l'eau [méthode d'essai A.6 (22)];

   — le coefficient de partage octanol-eau (K_{oe}) [méthodes d'essai A.8, A.24 (22)];

   — le coefficient de partage sédiment-eau, exprimé par $K_d$ou K_{co} [méthode d'essai C.19 (22)];

   — les propriétés vis-à-vis de l'hydrolyse [méthode d'essai C.7 (22)];

   — la phototransformation dans l'eau (23);

   — la pression de vapeur [méthode d'essai A.4 (22)];

   — la biodégradabilité immédiate [méthodes d'essai C.4 et C.29 (22)];

   — la tension de surface [méthode d'essai A.5 (22)];

   — la concentration micellaire critique (24).

   Par ailleurs, les informations suivantes, lorsqu'elles sont disponibles, sont pertinentes:

   — la biodégradation en environnement aquatique [méthodes d'essai C.24 et C.25 (22)];

   — la constante de la loi de Henry.

10. Des substances d'essai radiomarquées peuvent faciliter l'analyse de l'eau, du sédiment et des échantillons biologiques et peuvent être employées afin de déterminer si l'identification et la quantification des produits de dégradation doivent être conduites. La méthode décrite ici a été validée par un essai comparatif interlaboratoires international (12), pour des substances marquées au ^{14}C. Si l'ensemble des résidus marqués est mesuré, le facteur de bioaccumulation (FBA) est basé sur la substance parente incluant les éventuels produits de dégradation retenus. Il est également possible de combiner une

▼M6

étude du métabolisme et une étude de bioaccumulation par l'analyse et la quantification du pourcentage de la substance parente et de ses produits de dégradation dans des échantillons prélevés à la fin de la phase d'absorption ou au niveau du pic de bioaccumulation. Dans tous les cas, il est recommandé que le calcul du FBA se base sur la concentration de la substance parente dans les organismes et pas uniquement sur le total des résidus radioactifs.

11. En plus des propriétés de la substance d'essai, une autre information nécessaire est la toxicité envers les espèces oligochètes devant être utilisées dans l'essai, comme la concentration létale médiane (CL_{50}) pour la durée nécessaire à la phase d'absorption, afin de s'assurer que les concentrations d'exposition retenues son bien inférieures aux niveaux toxiques. Si elles sont disponibles, la préférence devrait être donnée aux valeurs de toxicité issues d'études sur le long terme sur des critères d'évaluation sublétaux (CE_{50}). En cas d'indisponibilité de ces données, un test de toxicité aiguë dans des conditions identiques à celles de l'essai de bioaccumulation, ou des données toxicologiques concernant d'autres espèces substitutives peuvent fournir des informations utiles.

12. Une méthode analytique appropriée, d'incertitude, de précision et de sensibilité connues pour la quantification de la substance dans les solutions, le sédiment et le matériau biologique d'essai doit être disponible, ainsi que les détails de la préparation et du stockage des échantillons et les fiches de données de sécurités des substances. Les limites de détection analytiques de la substance d'essai dans l'eau, le sédiment et les tissus du ver devraient également être connues. Si une substance d'essai radiomarquée est utilisée, la radioactivité spécifique (c.-à-d. en $Bq.mol^{-1}$), la position de l'atome marqué et le pourcentage de radioactivité associé aux impuretés doivent également être connus. La radioactivité spécifique de la substance d'essai devrait être aussi élevée que possible afin de permettre la détection de concentrations aussi faibles que possible (11).

13. Des informations sur les caractéristiques du sédiment utilisé (p. ex. l'origine du sédiment ou de ses constituants, son pH et la concentration en ammoniaque de l'eau interstitielle (sédiments naturels) la teneur en carbone organique (COT), la distribution de taille des particules (le pourcentage de sable, de limon et d'argile) et le pourcentage de masse sèche) devraient être accessibles (6).

PRINCIPE DE L'ESSAI

14. L'essai consiste en deux phases, la phase d'absorption (exposition) et la phase d'élimination (post-exposition). Durant la phase d'absorption, des vers sont exposés au sédiment enrichi avec la substance d'essai, recouverts d'eau reconstituée et convenablement équilibrée (11). Des groupes de vers témoins sont conservés dans des conditions identiques, sans la substance d'essai.

15. Pour la phase d'élimination les vers sont transférés dans un système sédiment-eau ne contenant pas la substance d'essai. Une phase d'élimination est nécessaire afin de recueillir des informations sur la vitesse à laquelle la substance d'essai est excrétée par l'organisme d'essai (19)(25). Une phase d'élimination est toujours nécessaire sauf si l'absorption de la substance d'essai au cours de la phase d'exposition s'avère être non significative (p. ex. aucune différence statistique entre la concentration de la substance d'essai dans les vers d'essai et dans les vers témoins). Si un état quasi stationnaire n'a pas été atteint durant la phase d'absorption, il est possible de réaliser une détermination de la cinétique — constantes de vitesse d'absorption et d'élimination, FBA_k, en utilisant les résultats de la phase d'élimination. Une évolution de la concentration de la substance d'essai dans/sur les vers est suivie sur l'ensemble des deux phases de l'essai.

16. Durant la phase d'absorption, on conduit des mesures jusqu'à ce que le FBA atteigne un plateau ou un état quasi stationnaire. Par défaut, la durée de la phase d'absorption devrait être de 28 jours. La pratique a montré qu'une phase d'absorption de 12 à 14 jours suffit, pour plusieurs substances organiques neutres stables, à atteindre un état quasi stationnaire (6) (8) (9).

▼**M6**

17. Toutefois, si l'état quasi stationnaire n'est pas atteint dans les 28 jours, la phase d'élimination est démarrée en transférant les oligochètes exposés dans des récipients contenant le même milieu sans la substance d'essai. La phase d'élimination est achevée soit lorsqu'on atteint un niveau de 10 % de la concentration mesurée dans les vers au 28e jour de la phase d'absorption, soit après une durée de 10 jours au maximum. Le niveau résiduel dans les vers à la fin de la phase d'élimination est relevé comme un critère d'évaluation supplémentaire, p. ex. comme résidus non éliminés (RNE). Le facteur de bioaccumulation (FBA_{ss}) est calculé de préférence à la fois comme le rapport de la concentration dans les vers (C_a) à celle dans le sédiment (C_s) à un état quasi stationnaire apparent, et comme un facteur de bioaccumulation cinétique, FBA_k comme le rapport de la constante de vitesse d'absorption à partir du sédiment (k_s) à la constante de vitesse d'élimination (k_e) en supposant une cinétique du premier ordre. Si aucun état quasi stationnaire n'est atteint dans les 28 jours, calculer FBA_k à partir des constantes de vitesse d'absorption et d'élimination. Pour les calculs, voir l'Apendice 2. Si une cinétique du premier ordre ne s'applique pas, des modèles plus complexes devront être utilisés [Appendice 2 et référence (25)].

18. Si aucun état quasi stationnaire n'est atteint dans les 28 jours, de manière facultative, la phase d'absorption peut être prolongée en soumettant les groupes de vers exposés — s'ils sont disponibles — à des mesures supplémentaires jusqu'à atteindre un état quasi stationnaire. En parallèle, la phase d'élimination devrait néanmoins débuter au 28^e jour de la phase d'absorption.

19. La constante de vitesse d'absorption, la constante de vitesse d'élimination (ou les constantes, dans le cas de modèles plus complexes), le facteur de bioaccumulation cinétique (FBA_K), et lorsque cela est possible, les limites de confiance de chacun de ces paramètres sont calculés à partir des équations du modèle numérique (voir les modèles en Appendice 2). La pertinence d'un modèle peut être déterminée à partir du coefficient de corrélation ou du coefficient de détermination (des coefficients proches de 1 indiquent un bon accord).

20. Pour réduire la dispersion des résultats pour des substances organiques de lipophilie élevée, les facteurs de bioaccumulation devraient être exprimés en plus en relation avec la teneur en liquide des organismes d'essai et avec la teneur en carbone organique (COT) du sédiment (facteur d'accumulation biote-sédiment ou BSAF en kg de sédiment COT.kg^{-1} de teneur en lipide des vers). Cette approche se base sur des corrélations expérimentales et théoriques pour le compartiment aquatique, où — pour certaines classes chimiques — il existe une relation claire entre le potentiel d'une substance à être bioaccumulée et sa lipophilie, laquelle a été clairement établie pour des organismes modèles comme le poisson (14) (26) (27). Il existe également une relation entre la teneur en lipide du poisson d'essai et la bioaccumulation observée de ces substances. Pour les organismes benthiques, des corrélations similaires ont été trouvées (15) (16) (17) (18). Si on dispose de suffisamment de tissu de vers, il est possible de déterminer la teneur en lipide des animaux d'essai sur le même matériau biologique que celui utilisé pour déterminer la concentration de la substance d'essai. Toutefois, il est plus pratique d'utiliser des animaux témoins acclimatés au moins pour démarrer ou — de préférence — à la fin de la phase d'absorption pour mesurer la teneur en lipide, laquelle peut ensuite être utilisée pour normaliser les valeurs de FBA.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

21. Pour qu'un essai soit valable, les conditions suivantes doivent être satisfaites:

— La mortalité cumulée des vers (témoins et traités) jusqu'à la fin de l'essai, ne devrait pas dépasser 20 % du nombre initial.

— De plus, il devrait être prouvé que les vers s'enfouissent dans le sédiment pour prendre en compte une exposition maximum. Voir le paragraphe 28 pour les détails.

▼M6

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Espèces d'essai

22. Différentes espèces d'oligochètes aquatiques se prêtent à l'essai. Les espèces les plus couramment employées sont listées en Annexe 6.

23. Les essais de toxicité (96 h, dans l'eau seule) devraient être conduits à intervalles réguliers (p.ex. chaque mois) par rapport à un composé toxique de référence tel que le chlorure de potassium (KCl) ou le sulfate de cuivre ($CuSO_4$) (1) afin de démontrer l'état de santé des animaux d'essai (1) (6). Si aucun essai de toxicité de référence n'est conduit à intervalles réguliers, le lot d'organismes devant être utilisés dans un essai de bioaccumulation sédimentaire doit être vérifié à l'aide d'un composé toxique de référence. La mesure de la teneur en lipide pourrait également fournir des informations utiles sur l'état des animaux.

Culture des organismes d'essai

24. Afin de disposer d'un nombre suffisant de vers pour conduire les essais de bioaccumulation, il pourra être nécessaire de conserver les vers dans une culture de laboratoire mono-espèce permanente. Les méthodes de culture en laboratoire pour les espèces d'essai retenues sont résumées en Appendice 6. Pour les détails, voir les références (8) (9) (10) (18) (28) (29) (30) (31) (32).

Appareillage

25. On doit veiller à tout moment à ne pas utiliser pour l'appareillage des matériaux susceptibles de dissoudre ou absorber les substances d'essai ou pouvant libérer des substances ayant un effet délétère sur les animaux d'essai. Des chambres rectangulaires ou cylindriques standard, faites d'un matériau chimiquement inerte et présentant une capacité adaptée au taux de charge, c.-à-d. au nombre de vers d'essai, peuvent être utilisées. Il convient d'éviter l'utilisation de tubes en plastique souples pour l'administration d'eau ou d'air. Du polytétrafluoroéthylène, de l'acier inoxydable et/ou du verre devront être utilisés pour tout équipement entrant en contact avec le milieu faisant l'objet de l'essai. Du verre silanisé peut s'avérer nécessaire pour des substances de coefficient d'adsorption élevé comme les pyréthroïdes synthétiques. Dans de telles circonstances, l'équipement devra être jeté après usage (5). Pour des substances d'essai radiomarquées et pour des substances chimiques volatiles, on doit prendre soin d'éviter l'évaporation et la perte des substances d'essai. Il convient d'utiliser des pièges (p. ex. des flacons de lavage des gaz) contenant un absorbant permettant de capter d'éventuels résidus s'évaporant des chambres d'essai (11).

Eau

26. L'eau surjacente doit être d'une qualité permettant la survie des espèces d'essai durant les périodes d'acclimatation et d'essai, sans qu'elle ne présente un aspect ou un comportement anormal. Pour l'eau surjacente, tant pour les essais que pour les cultures de laboratoire, il est recommandé d'utiliser une eau reconstituée selon la méthode d'essai C.1 (25). Il a été démontré que plusieurs espèces d'essai peuvent survivre, croître et se reproduire dans cette eau (8); une normalisation maximum des conditions d'essai et de culture est proposée. L'eau devrait être caractérisée au moins par son pH, sa conductivité et sa dureté. La recherche de micropolluants dans l'eau, préalablement à son utilisation pourrait fournir des informations utiles (Appendice 4).

27. L'eau devrait être de qualité constante sur toute la durée de l'essai. Le pH de l'eau surjacente devrait être compris entre 6 et 9. La dureté totale devrait être comprise entre 90 et 400 mg de $CaCO_3$ par litre au début de l'essai (7). Les plages de pH et de dureté dans l'eau reconstituée mentionnée sont données

▼M6

dans la méthode d'essaire C.1 (25). Si une interaction est suspectée entre la dureté de certains ions et la substance d'essai, une eau moins dure devrait être utilisée. L'Appendice 4 résume des critères supplémentaires pour une eau de dilution acceptable selon la ligne directrice 210 de l'OCDE (34).

Sédiment

28. Le sédiment doit être d'une qualité permettant la survie et de préférence la reproduction des organismes d'essai durant les périodes d'acclimatation et d'essai, sans qu'ils ne présentent un aspect ou un comportement anormal. Les vers devront s'enfouir dans le sédiment. Le comportement d'enfouissement peut avoir une influence sur l'exposition et donc sur le FBA. Par conséquent, la tendance à éviter le sédiment ou comportement fouisseur des organismes d'essai devra être observée, lorsque la turbidité de l'eau surjacente le permet. Les vers (témoins et traités) devront s'enfouir dans le sédiment dans les 24 h à compter de leur addition au récipient d'essai. Si on observe de manière permanente un défaut d'enfouissement ou un évitement du sédiment (p. ex. plus de 20 % sur plus de la moitié de la phase d'absorption), ceci indique soit que les conditions de l'essai ne sont pas appropriées, soit que les organismes d'essai ne sont pas en bonne santé, soit encore que la concentration de la substance chimique d'essai provoque ce comportement. Dans ce cas, l'essai devra être arrêté et répété en améliorant les conditions. Il est possible d'obtenir des informations supplémentaires sur l'ingestion du sédiment en utilisant les méthodes décrites dans (35) et (36), qui précisent l'ingestion de sédiments ou la sélection de particules par les organismes d'essai. Si elles sont observables, au moins la présence ou l'absence de coprolithes à la surface du sédiment, qui indiquent l'ingestion du sédiment par les vers, devraient être relevées et prises en compte dans l'interprétation des résultats de l'essai du point de vue du trajet d'exposition.

29. On recommande l'utilisation d'un sédiment artificiel basé sur le sol artificiel décrit dans la méthode d'essai C.8 (40) à la fois pour l'essai et pour les cultures des vers en laboratoire (Appendice 5), puisque des sédiments naturels de qualité appropriée ne sont pas disponibles tout au long de l'année. De plus, l'essai pourrait être influencé par la présence éventuelle d'organismes indigènes ainsi que de micropolluants dans des sédiments naturels. Le sédiment artificiel permet à différentes espèces d'essai de survivre, croître et se reproduire (8).

30. Le sédiment artificiel devrait être caractérisé au moins par l'origine de ses constituants, la distribution de taille de particule, (le pourcentage de sable, de limon et d'argile), la teneur en carbone organique (COT), la teneur en eau et le pH. La mesure du potentiel redox est facultative. Toutefois, il est possible d'utiliser des sédiments naturels, provenant de sites non pollués, comme sédiment d'essai et/ou de culture (1). Les sédiments naturels devraient être caractérisés au moins par leur origine (le site de prélèvement), le pH et la teneur en ammoniaque de l'eau interstitielle, la teneur en carbone organique (COT), la distribution de taille de particule, (le pourcentage de sable, de limon et d'argile), et la teneur en eau (6). Si un dégagement d'ammoniaque est attendu, on recommande de conditionner le sédiment naturel durant sept jours dans les conditions du test à venir, avant de l'enrichir avec la substance d'essai. À la fin de cette période de conditionnement, l'eau surjacente devra être enlevée et éliminée. La recherche de micropolluants dans le sédiment ou ses constituants, préalablement à son utilisation pourrait fournir des informations utiles.

Préparation

31. La manipulation des sédiments naturels préalablement à leur utilisation en laboratoire est décrite dans (1) (6) (44). La préparation du sédiment artificiel est décrite en Appendice 5.

▼M6

Stockage

32. Le stockage de sédiments naturels au laboratoire devrait être aussi court que possible. L'Agence de Protection de l'Environnement américaine (6) recommande une durée maximum de stockage de 8 semaines à 4 °C ± 2 °C à l'abri de la lumière. Aucun espace libre ne doit être présent au-dessus du sédiment dans le récipient de stockage. L'Appendice 5 donne des recommandations concernant le stockage de sédiments artificiels.

Application de la substance d'essai

33. La substance d'essai est dispersée sur le sédiment. La procédure de dispersion implique le revêtement d'un ou plusieurs des constituants du sédiment avec la substance d'essai. Par exemple, le sable de quartz, ou une portion de celui-ci (p. ex. 10 g de sable de quartz par récipient d'essai), peut être trempé dans une solution de la substance d'essai dans un solvant adapté, lequel est ensuite lentement évaporé à sec. La fraction revêtue peut ensuite être mélangée avec le sédiment mouillé. La quantité de sable apportée avec la substance d'essai et le mélange de sable doivent être pris en compte lors de la préparation du sédiment, c.-à-d. que le sédiment doit alors être préparé avec moins de sable (6).

34. Pour un sédiment naturel, la substance d'essai peut être ajoutée par dispersion sur une portion séchée du sédiment ainsi que cela est décrit plus haut pour le sédiment artificiel, ou par mélange avec le sédiment mouillé, puis évaporation de l'agent de solubilisation éventuellement utilisé. Des solvants adaptés à la dispersion sur sédiment mouillé sont l'éthanol, le méthanol, l'éthylène glycol monométhyl éther, l'éthylène glycol diméthyl éther, le diméthylformamide et le triéthylène glycol (5) (34). La toxicité et la volatilité du solvant et la solubilité de la substance d'essai dans le solvant choisi doivent être les principaux critères de sélection d'un agent de solubilisation adapté. Des conseils supplémentaires sur les procédures de dispersion sont donnés dans Environment Canada (1995) (41). On doit prendre des précautions pour s'assurer que la substance chimique d'essai ajoutée au sédiment est distribuée régulièrement et dans l'ensemble du sédiment. Des sous-échantillons du sédiment enrichi, d'expériences identiques, devraient être analysés afin de vérifier les concentrations en substance d'essai dans le sédiment et afin de déterminer le degré d'homogénéité de la distribution de la substance d'essai.

35. Une fois le sédiment enrichi préparé, avec une couche d'eau surjacente, il est souhaitable de laisser la substance d'essai se partager entre le sédiment et la phase aqueuse. Ceci devrait de préférence être réalisé dans les conditions de température et d'aération de l'essai. La durée d'équilibration appropriée dépend du sédiment et de la substance chimique et peut être de l'ordre de quelques heures à quelques jours, et dans quelques rares cas jusqu'à plusieurs semaines (4 à 5 semaines) (28) (42). Dans cet essai, on n'attend pas l'équilibre mais une période d'équilibration de 48 h à 7 jours est recommandée. Selon l'objectif de l'étude, p. ex. lorsqu'il s'agit de simuler des conditions environnementales, il peut être nécessaire d'équilibrer ou de vieillir le sédiment enrichi plus longtemps (11).

RÉALISATION DE L'ESSAI

Essai préliminaire

36. Il peut être utile de conduire une expérience préliminaire afin d'optimiser les conditions de l'essai définitif, p. ex. choix des concentrations des substances testées et durées des phases phase d'absorption et d'élimination. Le comportement des vers, par exemple évitement du sédiment, c.-à-d. que les vers quittent le sédiment, ce qui peut être dû à la substance d'essai et/ou au

▼M6

sédiment lui-même, devrait être observé et noté durant un essai préliminaire. L'évitement du sédiment peut également être utilisé comme paramètre sublétal dans un essai préliminaire pour l'estimation des concentrations des substances d'essai à utiliser dans un essai de bioaccumulation.

Conditions d'exposition

Durée de la phase d'absorption

37. Les organismes d'essai sont exposés à la substance d'essai durant la phase d'absorption. Le premier échantillon devrait être prélevé entre 4 et 24 h après le début de la phase d'absorption. La phase d'absorption devrait être conduite durant 28 jours au plus (1) (6) (11), sauf s'il peut être démontré qu'un équilibre a été atteint plus rapidement. On identifie un état quasi stationnaire par: (i) un tracé des facteurs de bioaccumulation pour chaque période d'échantillonnage en fonction du temps, parallèle à l'axe du temps, (ii) trois analyses successives de FBA réalisées sur des échantillons prélevés à des intervalles d'au moins deux jours, ne différant pas de plus de ± 20 % l'une par rapport à l'autre, et (iii) une absence de différence significative entre les trois périodes d'échantillonnage (sur la base de comparaisons statistiques, p. ex. l'analyse de la variance et une analyse par régression). Si l'état quasi stationnaire n'a pas été atteint après 28 jours, il est possible de clore la phase d'absorption en démarrant la phase d'élimination et il est possible de calculer le FBA_K à partir des constantes de vitesse d'absorption et d'élimination (voir également les paragraphes 16 à 18).

Durée de la phase d'élimination

38. Le premier échantillon devrait être prélevé entre 4 et 24 h après le début de la phase d'élimination car des modifications peuvent survenir dans les résidus de tissu durant de la période initiale. Il est recommandé de clore la phase d'élimination soit lorsque la concentration de substance d'essai est inférieure à 10 % de la concentration de l'état quasi stationnaire, soit après une durée de 10 jours. Le niveau résiduel dans les vers à la fin de la phase d'élimination est relevé comme un critère d'évaluation secondaire. La période peut toutefois être définie par la durée pendant laquelle la concentration de la substance d'essai dans les vers est supérieure à la limite de détection analytique.

Organismes d'essai

Nombre de vers d'essai

39. Le nombre de vers par échantillon doit fournir une masse de tissu de vers telle que la masse de la substance d'essai par échantillon au début de la phase d'absorption et à la fin de la phase d'élimination soient, significativement supérieures à la limite de détection de la substance d'essai dans le matériau biologique. Dans les phases mentionnées d'absorption et d'élimination la concentration dans les animaux d'essai est généralement relativement faible (6) (8) (18). Comme le poids individuel de nombreuses espèces d'oligochètes aquatiques est très faible (5 à 10 mg de poids humide par individu pour *Lumbriculus variegatus* et *Tubifex tubifex*), il est possible de réunir les vers de chambres d'essai d'expériences identiques données pour la pesée et l'analyse de la substance chimique d'essai. Pour les espèces d'essai de poids individuel supérieur (p. ex. *Branchiura sowerbyi*), il est possible d'utiliser des expériences identiques contenant un unique individu, mais dans ce cas le nombre d'expériences identiques doit être augmenté à cinq par point d'échantillonnage (11). On doit toutefois avoir à l'esprit que *B. sowerbyi* ne faisait pas partie de l'essai comparatif interlaboratoires (12) et il ne fait par conséquent pas partie des espèces préférables de la ligne directrice préliminaire.

40. Des vers de taille similaire devraient être utilisés (pour *L. variegatus* voir l'Appendice 6). Ils devraient provenir de la même source et devraient être des animaux adultes ou de gros animaux de la même classe d'âge (voir l'Appendice 6). Le poids et l'âge d'un animal peuvent avoir un effet significatif sur les valeurs de FBA (p. ex. du fait d'une teneur en lipide différente et/ou de la présence d'œufs); ces paramètres devraient être relevés avec précision. Afin de mesurer le poids moyen et le poids sec, un sous échantillon de vers devrait être pesé avant de débuter l'essai.

▼M6

41. Avec *Tubifex tubifex* et *Lumbriculus variegatus*, on peut s'attendre à observer une reproduction sur la durée de l'essai. Une absence de reproduction lors d'un essai de bioaccumulation devrait être relevée et prise en compte lors de l'interprétation des résultats.

Charge

42. Il est recommandé d'utiliser des rapports sédiment/vers et eau/vers élevés afin de minimiser la réduction de la concentration de la substance d'essai dans le sédiment durant la phase d'absorption et d'éviter une réduction de la concentration en oxygène dissous. Les taux de charge choisis devraient également correspondre à des densités de population observées dans la nature pour l'espèce choisie (43). Par exemple, pour *Tubifex tubifex*, on recommande un taux de charge de 1 à 4 mg de tissu de ver (poids humide) par gramme de sédiment humide (8) (11). Les références (1) et (6) recommandent un taux de charge ≤ 1 g de poids sec de tissu de ver pour 50 g de carbone organique sédimentaire, pour *L. variegatus*.

43. Les vers utilisés lors d'un essai sont extraits de la culture par tamisage du sédiment de culture. Les animaux (adultes ou gros vers sans signes de fragmentation récente) sont transférés dans des récipients en verre (p. ex. des boîtes de Petri) contenant une eau propre. Si les conditions de l'essai diffèrent des conditions de culture, une phase d'acclimatation de 24 h devrait suffire. Avant la pesée, l'excès d'eau doit être séparé des vers. Ceci peut être fait en plaçant les vers avec précaution sur un mouchoir en papier préhumidifié. Il est déconseillé d'utiliser un papier absorbant pour sécher les vers car celui-ci peut provoquer un stress ou abîmer les vers. Brunson et al. (1998) recommandent l'utilisation de vers non épongés d'environ 1,33 fois la biomasse cible. Ces 33 % supplémentaires correspondent à la différence entre des vers épongés et non épongés (28).

44. Au début de la phase d'absorption (jour 0 de l'essai), les organismes d'essai sont transférés depuis la chambre d'acclimatation et distribués aléatoirement dans des récipients (p. ex. des boîtes de Petri) contenant de l'eau reconstituée, en ajoutant les vers par deux dans chaque récipient, jusqu'à ce que chaque récipient en contienne dix. Chacun de ces groupes de vers est ensuite aléatoirement transféré dans des récipients d'essai séparés, p. ex. en utilisant une pince en acier souple. Les récipients d'essai sont ensuite incubés dans les conditions de l'essai.

Alimentation

45. Compte tenu de la faible teneur en nutriment du sédiment artificiel, le sédiment devra être complété d'une source alimentaire. Afin de ne pas sous-estimer l'exposition des organismes d'essai, p. ex. en apportant sélectivement une alimentation non contaminée, la nourriture nécessaire à la reproduction et à la croissance des organismes d'essai devrait être ajoutée au sédiment en une fois, avant ou durant l'application de la substance d'essai (voir l'Appendice 5).

Rapport sédiment/eau

46. Le rapport sédiment/eau recommandé est de 1:4 (45). On considère que ce rapport permet de conserver les concentrations en oxygène à des niveaux convenables et d'éviter l'accumulation d'ammoniaque dans l'eau surnageante. La teneur en oxygène dans l'eau surjacente devrait être conservée à une valeur ≥ 40 % de la saturation. L'eau surjacente des récipients d'essai devrait être doucement aérée (p. ex. 2 à 4 bulles par seconde) via une pipette pasteur située environ 2 cm au-dessus de la surface du sédiment de sorte à minimiser la perturbation du sédiment.

▼M6

Éclairement et température

47. La photopériode de la culture et de l'essai est de 16 heures (1) (6). L'intensité lumineuse dans la zone de l'essai devrait être maintenue à environ 500 à 1 000 lux. La température devrait être de 20 ± 2 °C sur toute la durée de l'essai.

Concentrations d'essai

48. L'une des concentrations d'essai (aussi faible que possible) est utilisée pour la détermination de la cinétique d'absorption, mais il est possible d'utiliser une seconde concentration (supérieure) [p. ex. (46)]. Dans ce cas, des échantillons sont prélevés et analysés à l'état quasi stationnaire ou après 28 jours afin de confirmer le FBA mesuré à la concentration la plus basse (11). La concentration supérieure devrait être choisie de sorte à ne pas provoquer d'effets délétères (p. ex; en se plaçant à environ 1 % en dessous de la concentration de toxicité chronique la plus basse connue EC_x provenant d'études de toxicité chronique pertinentes). La concentration d'essai la plus basse devrait être significativement supérieure à la limite de détection dans le sédiment et dans les échantillons biologiques selon la méthode analytique employée. Si la concentration d'effet de la substance d'essai est voisine de la limite de détection analytique, on recommande l'utilisation d'une substance d'essai radiomarquée, de radioactivité spécifique élevée.

Expériences identiques traitées et témoins

49. Le nombre minimum d'expériences identiques traitées pour les mesures de cinétique devrait être de trois par point d'échantillonnage (11), pour l'ensemble des phases d'absorption et d'élimination. Des expériences identiques supplémentaires devraient être utilisées p. ex. pour des dates d'échantillonnage supplémentaires facultatives. Pour la phase d'élimination, un nombre correspondant d'expériences identiques est préparé avec un sédiment et une eau surjacente non enrichis, de sorte que les vers traités puissent être transférés depuis des récipients traités donnés vers des récipients non traités à la fin de la phase d'absorption. Le nombre total d'expériences identiques traitées devrait être suffisant à la fois pour la phase d'absorption et pour la phase d'élimination.

50. En variante, il est possible d'exposer les vers destinés à être échantillonnés durant la phase d'élimination dans un grand container contenant un sédiment enrichi, du même lot que celui utilisé pour la cinétique d'absorption. Il doit être prouvé que les conditions de l'essai (p. ex. la profondeur du sédiment, le rapport sédiment/eau, la charge, la température, la qualité de l'eau) sont comparables aux expériences identiques destinées à la phase d'absorption. Une fois la phase d'absorption terminée, l'eau, le sédiment et les échantillons de vers devraient être prélevés de ce container pour analyse et un nombre suffisant de grands vers, ne présentant pas de signes de fragmentation récents, devraient être soigneusement extraits et transférés vers les expériences identiques préparées pour la phase d'élimination (p. ex. dix organismes par récipient d'expérience identique).

51. Si aucun solvant autre que l'eau n'a été utilisé, au moins 9 expériences identiques d'un contrôle négatif (au moins 3 échantillons au démarrage, 3 à la fin de la phase d'absorption et 3 à la fin de la phase d'élimination) devraient être fournies pour analyse biologique et du bruit de fond. Si un agent de solubilisation est utilisé pour l'application de la substance d'essai, il convient de contrôler le solvant (au moins 3 échantillons d'expériences identiques devraient être échantillonnés au démarrage, 3 à la fin de la phase d'absorption et 3 à la fin de la phase d'élimination). Dans ce cas, au moins 4 expériences identiques d'un contrôle négatif (sans solvant) devraient être fournies pour échantillonnage à la fin de la phase d'absorption. Ces expériences identiques peuvent être comparées biologiquement au contrôle du solvant afin d'obtenir des informations sur une éventuelle influence du solvant sur les organismes d'essai. L'Appendice 3 donne plus de détails.

▼M6

Fréquence des mesures de la qualité de l'eau

52. Durant les phases d'absorption et d'élimination, l'eau surjacente devrait faire l'objet de mesures de qualité, au minimum selon les paramètres suivants:

Température	dans un récipient de chaque niveau de traitement par date d'échantillonnage, et dans un récipient témoin, une fois par semaine et au départ et à la fin des phases d'absorption et d'élimination; la température peut également être enregistrée, p. ex. en continu ou à intervalles d'une heure, dans l'environnement (air ambiant ou bain d'eau) ou dans un récipient d'essai représentatif;
Teneur en oxygène dissous	dans un récipient de chaque niveau de traitement et dans un récipient témoin, par date d'échantillonnage, exprimée en mg/l et en % de la saturation à l'air;
Alimentation en air	contrôlée au moins une fois par jour (travaillé) et au besoin ajustée;
pH	dans un récipient traité de chaque niveau de traitement par date d'échantillonnage et dans un récipient témoin une fois par semaine et au début et à la fin des phases d'absorption et d'élimination;
Dureté totale de l'eau	au moins dans un récipient traité et dans un récipient témoin au début et à la fin des phases d'absorption et d'élimination, exprimée en mg de $CaCO_3$/l;
Teneur totale en ammoniaque	au moins dans un récipient traité et dans un récipient témoin au début et à la fin des phases d'absorption et d'élimination, exprimée en mg de NH^{4+} ou de NH_3 ou d'azote ammoniacal total par litre.

Échantillonnage et analyse des vers, du sédiment et de l'eau

Programme d'échantillonnage

53. L'Appendice 3 donne des exemples de programme d'échantillonnage pour une phase d'absorption de 28 jours et une phase d'élimination de 10 jours.

54. Échantillonner l'eau et le sédiment des chambres d'essai pour la détermination de la concentration de la substance d'essai avant addition des vers et durant les phases d'absorption et d'élimination. Durant l'essai, les concentrations de la substance d'essai sont déterminées dans les vers, le sédiment et l'eau, afin de suivre la distribution de la substance d'essai dans le compartiment du système d'essai.

55. Échantillonner les vers, le sédiment et l'eau à au moins six reprises durant la phase d'absorption, comme dans la phase d'élimination.

56. Poursuivre l'échantillonnage en continu jusqu'à atteindre un plateau (état quasi stationnaire) (voir l'Appendice 1) ou durant 28 jours. Si le plateau n'a pas été atteint dans les 28 jours, débuter la phase d'élimination. Au démarrage de la phase d'élimination, transférer les vers voulus vers des chambres des expériences identiques contenant un sédiment non traité et de l'eau (voir également les paragraphes 17 et 18).

Échantillonnage et préparation des échantillons

57. Les échantillons d'eau sont obtenus par décantation, siphonnage ou pipetage d'un volume suffisant pour la mesure de la quantité de la substance d'essai dans l'échantillon.

58. L'eau surjacente restante est soigneusement décantée ou siphonnée de la ou des chambres d'essai. Les échantillons de sédiment doivent être prélevés avec le plus grand soin, en dérangeant les vers au minimum.

▼**M6**

59. Enlever tous les vers des expériences d'essai identiques au moment de l'échantillonnage, p. ex. en mettant en suspension le sédiment avec l'eau surjacente et en étalant le contenu de chaque expérience identique sur un plateau peu profond et en prélevant les vers à l'aide d'une pince en acier souple. Les rincer rapidement à l'eau dans un récipient peu profond en verre ou en acier. Enlever l'eau en excès. Transférer délicatement les vers dans un récipient préalablement taré, et les peser. Sacrifier les vers par congélation (p. ex. ≤ – 18 °C). La présence et le nombre de cocons et/ou de jeunes devraient être relevés.

60. De manière générale, les vers devraient être pesés et sacrifiés immédiatement après l'échantillonnage, sans phase de purge de l'intestin, afin d'obtenir un FBA classique incluant le contenu de l'intestin contaminé et afin d'éviter des pertes de résidus corporels durant une éventuelle phase de purge de l'intestin dans de l'eau seule (8). Les composés de log K_{oe} supérieur à 5 ne sont pas censés être significativement éliminés durant une phase de purge des intestins dans l'eau seule, alors que les substances chimiques de log Koe inférieur à 4 peuvent être perdues en quantités significatives (47).

61. Durant la phase d'élimination, les vers purgent leur intestin dans le sédiment propre. Ceci signifie que les mesures réalisées immédiatement avant la phase d'élimination incluent le sédiment avec l'intestin contaminé, alors qu'après les 4 à 24 h initiales de la phase d'élimination, l'essentiel du contenu de l'intestin contaminé est supposé avoir été remplacé par du sédiment propre (11) (47). La concentration dans les vers de cet échantillon peut alors être considérée comme la concentration dans les tissus après la purge de l'intestin. Pour tenir compte de la dilution de la substance d'essai par du sédiment non contaminé durant la phase d'élimination, il est possible d'estimer le poids du contenu de l'intestin à partir des rapports poids des vers humides/poids des cendres de vers ou poids des vers secs/poids des cendres de vers.

62. Si l'objectif de l'étude est la mesure de la biodisponibilité et des résidus réels dans les tissus des organismes d'essai, alors au moins un sous-échantillon des animaux traités (provenant p. ex. de trois récipients d'expériences identiques supplémentaires), de préférence échantillonné durant l'état quasi stationnaire, devrait être pesé, purgé dans de l'eau propre durant 6 heures (47), et pesé de nouveau avant analyse. Les données de poids des vers et de concentrations corporelles de ces sous-échantillons peuvent ensuite être comparées aux valeurs obtenues à partir de vers purgés. Les vers destinés à une mesure d'élimination ne devraient pas être purgés avant le transfert vers le sédiment propre afin de minimiser le stress subi par les animaux.

63. Analyser de préférence l'eau, le sédiment et les échantillons de vers immédiatement (c.-à-d. dans les 1 à 2 jours) après extraction afin d'éviter une dégradation ou autres pertes et de calculer les vitesses d'absorption et d'élimination approximatives pendant le déroulement de l'essai. Une analyse immédiate permet également de déterminer sans retard l'atteinte du plateau.

64. Si les analyses ne sont pas réalisées immédiatement, les échantillons devront être stockés dans des conditions appropriées. Il convient d'obtenir les informations sur la stabilité et les conditions de stockage appropriées (p. ex. la durée et la température de stockage, les procédures d'extraction, etc.) pour la substance d'essai donnée, avant de débuter l'étude. Si ces informations ne sont pas disponibles et qu'elles sont jugées nécessaires, des tissus témoins contaminés peuvent être étudiés en parallèle afin de déterminer la stabilité au stockage.

Qualité de la méthode analytique

65. Comme l'ensemble de la procédure est essentiellement gouverné par l'incertitude, la précision et la sensibilité de la méthode analytique employée pour la substance d'essai, il convient de vérifier expérimentalement que la précision et la reproductibilité de l'analyse chimique, ainsi que la récupération de

▼M6

la substance d'essai à partir de l'eau, du sédiment ou des échantillons de vers sont satisfaisantes pour la méthode donnée. Vérifier également que la substance d'essai n'est pas détectable dans les chambres témoins, en concentrations supérieures au bruit de fond. Si nécessaire, corriger les valeurs de C_w, C_s et C_a pour les valeurs des récupérations et du bruit de fond du témoin. Pour l'ensemble de l'essai, manipuler tous les échantillons de manière à minimiser les contaminations et les pertes (résultant p. ex. d'une adsorption de la substance d'essai sur le dispositif d'échantillonnage).

66. La récupération globale et la récupération de la substance d'essai dans les vers, le sédiment, l'eau et le cas échéant, dans les pièges contenant des absorbants permettant de retenir la substance d'essai évaporée, devraient être enregistrées et consignées.

67. Puisque l'utilisation de substances radiomarquées est recommandée, il est possible d'analyser la radioactivité totale (c.-à-d. celle du produit parent et des produits de dégradation). Toutefois, si ceci est faisable du point de vue analytique, une quantification de la substance parente et des produits de dégradation à l'état quasi stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption peuvent fournir des informations importantes. Si on envisage de réaliser de telles mesures, les échantillons devraient alors être soumis à des procédures d'extraction appropriées de sorte que la substance parente puisse être quantifiée séparément. Lorsqu'un produit de dégradation détecté représente un pourcentage significatif (p. ex. > 10 %) de la radioactivité mesurée dans les organismes d'essai à l'état quasi stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption, on recommande l'identification de ces produits de dégradation (5).

68. Du fait de la faible biomasse individuelle, il est souvent impossible de déterminer la concentration de la substance d'essai dans chacun des vers, sauf à utiliser l'espèce d'essai Branchiura sowerbyi (poids humide: 40 à 50 mg par ver) (11). Par conséquent, le regroupement d'individus échantillonnés à partir d'un récipient d'essai donné est acceptable, mais ceci restreint les procédures statistiques pouvant s'appliquer aux données. Si une procédure et une puissance statistiques spécifiques sont des considérations importantes, alors l'essai devrait comprendre un nombre adéquat de chambres d'essai, d'animaux d'essais et/ou d'expériences identiques adaptés aux quantités, à la procédure et à la puissance voulues.

69. On recommande d'exprimer le FBA à la fois comme une fonction du poids total humide, du poids total sec et si nécessaire (p. ex. pour des substances fortement lipophiles), comme une fonction de la teneur en lipide et du COT du sédiment. La teneur en lipide doit être déterminée par des méthodes adaptées (48) (49). On peut recommander la technique d'extraction au chloroforme/méthanol (50) comme une méthode standard (48). Toutefois, afin d'éviter l'utilisation de solvants chlorés, il est possible d'utiliser une modification, qui a fait l'objet d'un essai comparatif interlaboratoires, de la méthode de Bligh & Dyer (50); celle-ci est décrite dans (51). Comme les diverses méthodes ne conduisent pas à des valeurs identiques (48), il est important de détailler la méthode employée. Lorsque cela est possible, c.-à-d. si on dispose de suffisamment de tissu de vers, la teneur en lipide est mesurée dans le même échantillon ou extrait que celui produit pour l'analyse de la substance d'essai, puisqu'il est souvent nécessaire d'éliminer les lipides de l'extrait avant de pourvoir le chromatographier (5). Toutefois, il est plus pratique d'utiliser des animaux témoins acclimatés au moins pour démarrer ou — de préférence — à la fin de la phase d'absorption pour mesurer la teneur en lipide, p. ex. dans trois échantillons.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

70. On obtient la courbe d'absorption de la substance d'essai en portant, en échelle linéaire, la concentration de la substance d'essai dans/sur les vers

▼M6

durant la phase d'absorption en fonction du temps. Si la courbe a atteint un plateau, calculer le FBA_{ss} à l'état quasi stationnaire:

$$\frac{C_a \text{ à l'état quasi stationnaire ou au } 28^e \text{ jour (moyenne)}}{C_S \text{ à l'état quasi stationnaire ou au } 28^e \text{ jour (moyenne)}}$$

71. Déterminer le facteur de bioaccumulation cinétique (FBA_K) comme le rapport de k_s/k_e. La constante d'élimination (k_e) est généralement déterminée à partir de la courbe d'élimination (c.-à-d. d'un tracé de la concentration de la substance d'essai dans les vers durant la phase d'élimination). La constante de vitesse d'absorption k_s est ensuite calculée à partir de la cinétique de la courbe d'absorption. La méthode préférée pour l'obtention du FBA_K et des constantes de vitesse, k_s, et k_e, consiste à utiliser des méthodes d'estimation des paramètres non linéaires à l'aide d'un ordinateur (voir l'Appendice 2). Si l'élimination n'est à l'évidence pas du premier ordre, alors des modèles plus complexes devraient être utilisés (26) (27) (52).

72. Le facteur d'accumulation biote-sédiment (BSAF) est déterminé en normalisant le FBA_K par rapport à la teneur en lipide des vers et à la teneur en carbone organique total du sédiment.

Interprétation des résultats

73. Les résultats devraient être interprétés avec précaution lorsque les concentrations mesurées lors des essais sont à des niveaux proches de la limite de détection de la méthode analytique employée.

74. Des courbes d'absorption et d'élimination clairement définies sont une indication de données de bioaccumulation de bonne qualité. En général, pour des études bien conçues, les limites de confiance des valeurs de FBA ne devraient pas dépasser 25 % (5).

Rapport d'essai

75. Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes.

Substance d'essai

— nature physique et propriétés physico-chimiques, p. ex. log K_{oe}, solubilité dans l'eau;

— données sur l'identification de la substance chimique; provenance de la substance d'essai, identités et concentrations des solvants éventuellement utilisés;

— dans le cas de radiomarquage, la position précise des atomes marqués, la radioactivité spécifique et le pourcentage de radioactivité associé aux impuretés.

Espèces d'essai

— nom scientifique, souche, origine, pré-traitement éventuel, acclimatation, âge, plage de taille, etc.

Conditions de l'essai

— procédure utilisée pour l'essai (p. ex. statique, semi-statique, ou dynamique);

— type et caractéristiques de l'éclairement utilisé et photopériode(s);

— conception de l'essai (p. ex. nombre, matériau et dimension des chambres d'essai, volume d'eau, masse et volume de sédiment, vitesse de remplacement de l'eau (pour les procédures dynamiques ou semi- statiques), éventuelle aération utilisée avant et durant l'essai, nombre d'expériences identiques, nombre de vers par expérience identique, nombre de concentrations d'essai, durée des phases d'absorption et d'élimination, fréquence d'échantillonnage);

▼M6

— méthode de préparation de la substance d'essai et d'application ainsi que les raisons du choix d'une méthode donnée;

— concentrations testées nominales;

— source des constituants de l'eau et du sédiment artificiels ou — si un milieu naturel est utilisé — origine de l'eau et du sédiment, description d'un éventuel prétraitement, résultats d'une éventuelle démonstration de l'aptitude des animaux d'essai à vivre et/ou à se reproduire dans le milieu utilisé, caractéristiques du sédiment (pH et teneur en ammoniac de l'eau interstitielle (pour les sédiments naturels), teneur en carbone organique (COT), distribution de taille de particule (pourcentage de sable, de limon et d'argile), teneur en eau en pourcentage et toutes autres mesures réalisées) et caractéristiques de l'eau (pH, dureté, conductivité, température, concentration en oxygène dissous, niveaux de chlore résiduels (s'il est mesuré) et toutes autres mesures réalisées);

— poids sec mesuré et nominal en % du poids humide (ou rapport poids sec/poids humide) du sédiment artificiel, poids sec mesuré en % du poids humide (ou rapport poids sec/poids humide) pour les sédiments naturels;

— qualité de l'eau dans les chambres d'essai, caractérisée par sa température, son pH, sa teneur en ammoniaque, sa dureté totale et sa concentration en oxygène dissous;

— informations détaillées sur le traitement des échantillons d'eau, de sédiment et de vers, y compris les détails concernant la préparation, le stockage, les procédures d'enrichissement en substance d'essai, l'extraction et les procédures analytiques (et leur précision) pour la substance d'essai et la teneur en lipide, et les méthodes de récupération de la substance d'essai.

Résultats

— mortalité des vers témoins et des vers dans chaque chambre d'essai et éventuels effets sous-létaux observés, y compris un comportement anormal (p. ex. évitement du sédiment, présence ou absence de coprolithes, absence de reproduction);

— mesure du poids sec en % du poids humide (ou rapport poids sec/poids humide) du sédiment et des organismes d'essai (utiles pour la normalisation);

— teneur en lipide des vers;

— courbe montrant les cinétiques d'absorption et d'élimination de la substance d'essai chez les vers, et la durée pour atteindre l'état quasi stationnaire;

— C_a, C_s et C_w (avec écart type et étendue, si nécessaire) pour toutes les dates d'échantillonnage (Ca exprimé en $g.kg^{-1}$ de poids humide et sec de l'ensemble du corps, Cs exprimé en $g.kg^{-1}$ de poids humide et sec de sédiment, et Cw en $mg.l^{-1}$). Si un facteur d'accumulation biote-sédiment (BSAF, voir la définition en Appendice 1) est nécessaire (p. ex. pour une comparaison des résultats entre deux essais ou plus réalisés avec des animaux de teneur en lipide différente), Ca devrait en plus être exprimé en $g.kg^{-1}$ de teneur en lipide de l'organisme et Cs devrait être exprimé en $g.kg^{-1}$ de carbone organique (CO) du sédiment;

— on peut également rapporter en plus les données suivantes: FBA (exprimé en kg de sédiment $humide.kg^{-1}$ de ver humide), constante de vitesse d'absorption sédimentaire ks (exprimée en g de sédiment $humide.kg^{-1}$ de vers $humides.j^{-1}$), et la constante de vitesse d'élimination ke (exprimée en j^{-1}); BSAF (exprimé en kg de CO du $sédiment.kg^{-1}$ de teneur en lipide des vers);

▼**M6**

— résidus non éliminés (RNE) à la fin de la phase d'élimination;

— le cas échéant: les pourcentages de substance parente, les produits de dégradation et les résidus liés (c.- à-d. le pourcentage de substance d'essai ne pouvant être extraite par les méthodes d'extraction courantes) détectés dans les animaux d'essai;

— méthodes utilisées pour les analyses statistiques des données.

Évaluation des résultats

— conformité des résultats avec les critères de validité tels qu'ils sont listés au paragraphe 21;

— résultats inattendus ou inhabituels, p. ex. élimination incomplète de la substance d'essai des animaux d'essai; dans ce cas, les résultats d'une éventuelle étude préliminaire peuvent fournir des informations utiles

▼M6

Appendice 1

Définitions et unités

Sédiment artificiel, ou sédiment formulé, reconstitué ou synthétique: mélange de matériaux utilisé pour simuler les composants physiques d'un sédiment naturel.

Bioaccumulation: augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme, par rapport à la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant. La bioaccumulation est le résultat combiné des processus de bioconcentration et de bioamplification (voir ci-dessous).

Facteur de bioaccumulation (FBA): concentration de la substance d'essai dans/sur l'organisme d'essai (C_a en $g.kg^{-1}$ de poids humide ou sec) divisée par la concentration de la substance dans le milieu environnant (C_s en $g.kg^{-1}$ de poids de sédiment humide ou sec) à tout instant durant la phase d'absorption d'un essai de bioaccumulation. Afin de conserver le lien avec C_a et C_s, le FBA est exprimé en kg de sédiment.kg^{-1} de ver (15).

Les facteurs de bioaccumulation calculés directement à partir du rapport de la constante de vitesse d'absorption sédimentaire divisée par la constante de vitesse d'élimination (k_s et k_e, respectivement — voir ci-dessous) sont dénommés facteurs de bioaccumulation cinétique (FBA_k).

Bioconcentration: augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme, résultant exclusivement de l'absorption via la surface du corps, par rapport à la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant.

Bioamplification: augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme, résultant principalement de l'absorption d'aliments ou de proies contaminés, par rapport à la concentration de la substance d'essai dans l'alimentation ou la proie. La bioamplification peut conduire à un transfert ou à une accumulation de la substance d'essai dans les réseaux trophiques.

Facteur d'accumulation biote-sédiment (BSAF): concentration de la substance d'essai à l'état quasi stationnaire normalisée par rapport aux lipides dans/sur l'organisme d'essai divisée par la concentration de la substance normalisée par rapport au carbone organique, dans le sédiment à l'état quasi stationnaire. C_a est alors exprimée en g kg^{-1} de teneur en lipides de l'organisme, et C_s en g kg^{-1} de teneur en carbone organique du sédiment.

Période de conditionnement: sert à stabiliser le composant microbien du sédiment et à enlever p. ex. l'ammoniaque provenant des composants du sédiment; elle a lieu avant l'enrichissement du sédiment avec la substance d'essai. Généralement, une fois le conditionnement terminé, l'eau surjacente est éliminée.

Élimination d'une substance d'essai: perte de cette substance par les tissus de l'organisme d'essai selon des processus actifs ou passifs survenant indépendamment de la présence ou de l'absence de la substance d'essai dans le milieu environnant.

Phase d'élimination: durée, suite au transfert des organismes d'essai depuis un milieu contaminé dans un milieu ne contenant pas la substance d'essai, durant laquelle est étudiée l'élimination (ou la perte nette) de la substance par les organismes.

Constante de vitesse d'élimination (k_e): valeur numérique définissant la vitesse de réduction de la concentration de la substance d'essai dans/sur l'organisme d'essai, suite au transfert des organismes d'essai depuis un milieu contenant la substance d'essai vers un milieu ne contenant pas la substance; k_e est exprimé en j^{-1}.

▼M6

Période d'équilibration: utilisée afin de tenir compte de la distribution de la substance d'essai entre la phase solide, l'eau interstitielle et l'eau surjacente; elle a lieu après l'enrichissement du sédiment avec la substance d'essai et avant l'addition des organismes d'essai.

Coefficient de partage octanol-eau (K_{oe}): rapport des solubilités de la substance dans le n-octanol et dans l'eau à l'équilibre; il est parfois exprimé par P_{oe}. Le logarithme de K_{oe} (log K_{oe}) est utilisé comme indicateur du potentiel de bioaccumulation de la substance par les organismes aquatiques.

Coefficient de partage carbone organique-eau (K_{co}): rapport de la concentration d'une substance dans/sur la fraction carbone organique d'un sédiment à la concentration de la substance dans l'eau à l'équilibre.

Eau surjacente: eau se trouvant au-dessus du sédiment dans le récipient d'essai.

Plateau ou **état quasi stationnaire**: définit l'équilibre entre les processus d'absorption et d'élimination survenant simultanément durant la phase d'exposition. L'état quasi stationnaire est atteint, dans le tracé du FBA pour chaque période d'échantillonnage en fonction du temps, lorsque la courbe devient parallèle à l'axe des temps et que trois analyses successives de FBA réalisées sur des échantillons pris à intervalles d'au moins deux jours se tiennent dans 20 % et qu'il n'y a pas de différence statistique significative entre les trois périodes d'échantillonnage. Pour les substances d'essai absorbées lentement, des intervalles plus appropriés seraient de sept jours (5).

Eau interstitielle, ou eau des pores: eau occupant l'espace entre les particules du sédiment ou du sol.

Constante de vitesse d'absorption sédimentaire (k_s): valeur numérique définissant la vitesse d'augmentation de la concentration de la substance d'essai dans/sur l'organisme d'essai résultant de l'absorption de la phase sédimentaire. k_s est exprimé en g de sédiment.kg^{-1} de ver.j^{-1}.

Sédiment enrichi: sédiment auquel une substance d'essai a été ajoutée.

Facteur de bioaccumulation à l'état quasi stationnaire (FBA_{ss}): FBA à l'état quasi stationnaire et n'évolue pas significativement dans le temps, la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant (C_s en g.kg^{-1} de poids de sédiment humide ou sec) étant constante sur cette durée.

Phase d'absorption ou d'exposition: durée pendant laquelle les organismes d'essai sont exposés à la substance d'essai.

▼M6

Appendice 2

Calcul des paramètres d'absorption et d'élimination

Le critère d'évaluation principal d'un essai de bioaccumulation est le facteur de bioaccumulation, FBA. Il est possible de calculer le FBA en divisant la concentration de la substance d'essai dans l'organisme d'essai, C_a, par la concentration de la substance d'essai dans le sédiment, C_s, à l'état quasi stationnaire. Si l'état quasi stationnaire n'est pas atteint durant la phase d'absorption, le FBA est calculé de la même manière pour le jour 28. Toutefois, on doit indiquer si le FBA est basé, ou non, sur des concentrations à l'état quasi stationnaire.

Les méthodes préférées pour l'obtention du facteur de bioaccumulation cinétique (FBA_K), de la constante de vitesse d'absorption sédimentaire (k_s) et de la constance de vitesse d'élimination (k_e) consistent à utiliser des méthodes d'estimation des paramètres non linéaires de manière informatique. Pour une série temporelle de facteurs d'accumulation (FA) moyens donnée (C_a, valeurs moyennes pour chaque date d'échantillonnage/C_s, valeurs moyennes pour chaque d'échantillonnage = FA) de la phase d'absorption basée sur le poids humide de ver et de sédiment, et l'équation modèle

$$FA(t) = FBA \times (1 - e^{ke \times t}) \qquad \text{[équation 1]}$$

où FA(t) est le rapport de la concentration de la substance d'essai dans les vers et de sa concentration dans le sédiment à un instant (t) quelconque de la phase d'absorption, ces programmes informatiques calculent les valeurs de FBA_K, k_s et k_e.

Lorsqu'on a atteint un état quasi stationnaire durant la phase d'absorption (c.-à-d. $t = \infty$), il est possible de réduire l'équation 1 à:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \qquad \text{[équation 2]}$$

où

k_s = constante de vitesse d'absorption [en g de sédiment.kg^{-1} de ver.j^{-1}]

k_e = constante de vitesse d'élimination [j^{-1}]

Ensuite $k_s/k_e \times C_s$ donne une valeur approchée de la concentration de la substance d'essai dans le tissu du ver à l'état quasi stationnaire ($C_{a,ss}$).

Le facteur d'accumulation biote-sédiment (BSAF) doit être calculé comme suit:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

où f_{oc} est la fraction de carbone organique dans le sédiment, et flip est la fraction de lipide dans le ver, toutes deux basées soit sur le poids sec, soit sur le poids humide.

Pour une série temporelle donnée de valeurs de concentrations, il est possible de modéliser les cinétiques d'élimination en utilisant les équations du modèle suivantes et un calcul informatique fondé sur une méthode d'estimation des paramètres non linéaire.

On recommande d'utiliser le résidu corporel moyen mesuré à la fin de la phase d'absorption comme point de départ par défaut. L'utilisation de la valeur modélisée/estimée à partir de la phase d'absorption ne devrait être utilisée que, p. ex. si la valeur mesurée s'écarte significativement du résidu corporel modélisé. Voir également le paragraphe 50 pour une variante de pré-exposition des vers destinés à l'élimination; avec cette approche, des échantillons de ces vers pré-exposés au jour 0 de la phase d'élimination sont supposés fournir une valeur du résidu corporel réaliste, avec laquelle il est possible de démarrer la cinétique d'élimination.

▼M6

Si le tracé des données en fonction du temps indique une décroissance exponentielle constante de la concentration de la substance d'essai dans les animaux, l'évolution temporelle de l'élimination peut être décrite par un modèle à un compartiment (équation 4).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \qquad \text{[équation 3]}$$

Les processus d'élimination semblent parfois évoluer en deux étapes, en montrant une décroissance rapide de C_a au cours des premières étapes, qui évolue vers une perte plus lente des substances d'essai dans les étapes ultérieures de l'élimination (8) (19) (26)). Les deux étapes peuvent être interprétées en faisant l'hypothèse de l'existence de deux compartiments dans l'organisme; compartiments à partir desquels la substance d'essai est éliminée à différentes vitesses. Dans ces cas particuliers, il convient d'étudier attentivement la littérature (15) (16) (17) (25).

L'équation ci dessous, par exemple, décrit une élimination à deux compartiments (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \qquad \text{[équation 4]}$$

A et B représentent les dimensions des compartiments (en pourcentage du résidu de tissu total), où A est le compartiment éliminant rapidement la substance et B est le compartiment ou l'élimination de la substance d'essai est la plus lente. La somme de A et de B fait 100 % de l'ensemble du volume du compartiment animal à l'état quasi stationnaire. k_a et k_b représentent les constantes d'élimination correspondantes [j^{-1}]. Si le modèle à deux compartiments correspond aux données de dépuration, il est possible de calculer la constante de vitesse d'absorption k_s comme suit (53) (54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \qquad \text{[équation 5]}$$

Quoi qu'il en soit, ces équations modèles doivent être utilisées avec précaution, en particulier lorsque des modifications de la biodisponibilité de la substance d'essai surviennent durant l'essai (42).

En variante aux équations modélisées décrites ci-dessus, il est également possible de calculer les cinétiques (k_s et k_e) en un essai, en appliquant un modèle de cinétique du premier ordre à toutes les données des phases d'absorption et d'élimination ensemble. Pour une description d'une méthode pouvant permettre un tel calcul combiné des constantes de vitesse d'absorption et d'élimination, consulter les références (55), (56) et (57).

Les résidus non éliminés (RNE) devraient être calculés comme un critère d'évaluation secondaire en multipliant le rapport de la concentration moyenne dans les vers (C_a) au dixième jour de la phase d'élimination à la concentration moyenne dans les vers (C_a) à l'état quasi stationnaire (28^e jour de la phase d'absorption) par 100:

$$\boldsymbol{RNE_{10j}[\%] = \frac{C_a \text{à la fin de l'élimination}(\text{moyenne}) \times 100}{C_a \text{à l'état quasi stationnaire}(\text{moyenne})}}$$

▼M6

Appendice 3

Exemple de planning d'échantillonnage pour un essai de bioaccumulation sur 28 jours

a) **Phase d'absorption (incluant une phase d'équilibration de 4 jours)**

Jour	Activités
– 6	Préparation d'une suspension de tourbe pour le sédiment, conditionnement de la suspension durant 48 h;
– 4	Enrichissement du sédiment ou d'une fraction du sédiment; mélange de tous les constituants du sédiment; prélèvement d'échantillons de sédiment des sédiments témoins traité et solvant pour détermination de la concentration en élément d'essai; ajout d'eau surjacente; incubation dans les conditions de l'essai (phase d'équilibration);
– 3/– 2	Séparation des organismes d'essai de la culture pour acclimatation;
0	Mesure de la qualité de l'eau (voir le paragraphe 52); retrait d'expériences identiques pour la prise d'échantillons d'eau et de sédiment pour la détermination de la concentration de substance d'essai; répartition aléatoire des vers dans les chambres d'essai conservation de suffisamment de sous-échantillons de vers pour la détermination des valeurs de bruit de fond analytique; contrôle de l'alimentation en air, dans le cas d'un système fermé;
1	Retrait d'expériences identiques pour échantillonnage; contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers, de la qualité de l'eau (voir le paragraphe 56); prélèvement d'échantillons d'eau, de sédiment et de vers pour la détermination de la concentration de la substance d'essai;
2	Contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers et de la température;
3	Comme au 1er jour;
4 - 6	Comme au 2e jour;
7	Comme au 1er jour; si nécessaire, compenser l'évaporation de l'eau;
8 - 13	Comme au 2e jour;
14	Comme au 1er jour; si nécessaire, compenser l'évaporation de l'eau;
15 - 20	Comme au 2e jour;
21	Comme au 1er jour; si nécessaire, compenser l'évaporation de l'eau
22 - 27	Comme au 2e jour;
28	Comme au 1er jour; mesure de la qualité de l'eau (voir le paragraphe 52); fin de la phase d'absorption; conservation de suffisamment de sous-échantillons de vers pour la détermination des valeurs de bruit de fond analytique, du poids sec et humide et de la teneur en lipide; transfère des vers depuis les expériences identiques exposées restantes vers des récipients contenant du sédiment propre pour la phase d'élimination (sans purge de l'intestin); échantillonnage de l'eau, du sédiment et des vers des témoins solvants; échantillonnage des solutions pièges, le cas échéant.
	Les activités de pré-exposition (phase d'équilibration) devraient être programmées en tenant compte des propriétés de la substance d'essai. Si nécessaire, conditionnement du sédiment préparé sous de l'eau surjacente à 20 ± 2 °C durant 7 jours; dans ce cas, préparation préalable du sédiment!
	Les activités décrites pour le 2e jour devraient être réalisées quotidiennement (au moins les jours travaillés).

▼**M6**

b) **Phase d'élimination**

Jour	Activités
– 6	Préparation d'une suspension de tourbe pour le sédiment, conditionnement de la suspension durant 48 h;
– 4	Mélange de tous les constituants du sédiment; prélèvement d'échantillons de sédiment des sédiments témoins traité et solvant pour détermination de la concentration en élément d'essai; ajout d'eau surjacente; incubation dans les conditions de l'essai;
0 (28e jour d'absorption)	Mesure de la qualité de l'eau (voir le paragraphe 52); transfert des vers depuis les de la phase expériences identiques exposées restantes vers les récipients contenant du sédiment propre; après **4 à 6 h**, retrait d'expériences identiques pour la prise d'échantillons d'eau, de sédiment et de vers pour la détermination de la concentration en substance d'essai; répartition aléatoire des vers dans les chambres d'essai;
1	Retrait d'expériences identiques pour échantillonnage; contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers, de la qualité de l'eau (voir le paragraphe 52); prélèvement d'échantillons d'eau, de sédiment et de vers pour la détermination de la concentration de la substance d'essai;
2	Contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers et de la température;
3	Comme au 1er jour;
4	Comme au 2e jour;
5	Comme au 1er jour;
6	Comme au 2e jour;
7	Comme au 1er jour; si nécessaire, compenser l'évaporation de l'eau;
8 - 9	Comme au 2e jour;
10	Comme au 1er jour; fin de la phase d'élimination; mesure de la qualité de l'eau (voir le paragraphe 52); échantillonnage de l'eau, du sédiment et des vers des témoins solvants; échantillonnage des solutions pièges, le cas échéant.
	La préparation du sédiment avant de débuter la phase d'élimination doit être conduite de la même manière que préalablement à la phase d'absorption.
	Les activités décrites pour le 2e jour devraient être réalisées quotidiennement (au moins les jours travaillés).

▼**M6**

Appendice 4

Quelques caractéristiques physico-chimiques d'une eau de dilution acceptable

CONSTITUANT	CONCENTRATIONS
Matière particulaire	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 µg/l
Ammoniaque non ionisée	< 1 µg/l
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	< 50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux plus biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

COMPOSITION DE L'EAU RECONSTITUÉE RECOMMANDÉE

a) Solution de chlorure de calcium

Dissoudre 11,76 g de $CaCl_2$ 2 H_2O dans de l'eau déionisée; ajuster à 1 l avec de l'eau déionisée

b) Solution de sulfate de magnésium

Dissoudre 4,93 g de $MgSO_4$ 7 H_2O dans de l'eau déionisée; ajuster à 1 l avec de l'eau déionisée

c) Solution de bicarbonate de sodium

Dissoudre 2,59 g de $NaHCO_3$ dans de l'eau déionisée; ajuster à 1 l avec de l'eau déionisée

d) Solution de chlorure de potassium

Dissoudre 0,23 g de KCl dans de l'eau déionisée; ajuster à 1 l avec de l'eau déionisée

Tous les produits chimiques doivent être de qualité analytique.

La conductivité de l'eau distillée ou déionisée ne doit pas dépasser 10 $\mu S.cm^{-1}$.

25 ml de chacune des solutions a) à d) sont mélangés et le volume total est ajusté à 1 l avec de l'eau déionisée. La somme des concentrations en ions calcium et magnésium dans cette solution est de 2,5 mmol/l.

Le rapport ionique Ca:Mg est de 4:1 et Na:K est de 10:1. La capacité acide $K_{S4,3}$ de cette solution est de 0,8 mmol/l.

Aérer l'eau de dilution jusqu'à atteindre la saturation en oxygène, puis la stocker durant approximativement deux jours sans aération supplémentaire avant utilisation.

Le pH d'une eau de dilution acceptable doit être dans la plage de 6 à 9.

▼M6

Appendice 5

Sédiment artificiel — recommandations pour la préparation et le stockage

Contrairement aux exigences de la méthode d'essai C.8 (40), on recommande une teneur en tourbe de 2 % pour le sédiment artificiel plutôt que de 10 %, du poids sec, afin de correspondre à une teneur organique faible à modérée des sédiments naturels (58).

Pourcentage des constituants secs du sédiment artificiel:

Constituant	Caractéristiques	% du sédiment sec
Tourbe	Tourbe de sphaigne, degré de décomposition: «moyen», séchée à l'air, pas de résidus végétaux visibles, finement broyée (taille de particules ≤ 0,5 mm)	2 ± 0,5
Sable de quartz	Taille de grains: ≤ 2 mm, mais > 50 % des particules doivent être dans la plage de 50 à 200 μm	76
Argile kaolinique	Teneur en kaolinite ≥ 30 %	22 ± 1
Aliments	*Folia urticae*, poudre de feuilles d' *Urtica sp.* (ortie brûlante), finement broyées (taille de particules ≤ 0,5 mm), ou un mélange de feuille en poudre d'*Urtica sp.* avec de la cellulose alpha (1:1); conformément aux normes de pharmacie, pour la consommation humaine; en plus du sédiment sec	0,4 - 0,5 %
Carbonate de calcium	$CaCO_3$, pulvérisé, chimiquement pur, en plus du sédiment sec	0,05 - 1
Eau déionisée	Conductivité ≤ 10 μS/cm, en plus du sédiment sec	30 - 50

Si on s'attend à une concentration élevée en ammoniaque, p. ex. si la substance d'essai est connue pour inhiber la nitrification, il peut être utile de remplacer 50 % de la poudre d'ortie riche en azote par de la cellulose (p. ex.,de la poudre de cellulose α, chimiquement pure, taille de particule ≤ 0,5 mm).

Préparation

La tourbe est séchée à l'air et broyée en une poudre fine (taille de grain ≤ 0,5 mm, pas de résidus végétaux visibles). Une suspension de la quantité de tourbe voulue est préparée en utilisant une partie de l'eau déionisée devant être ajoutée au sédiment sec [un volume d'eau de 11,5 × le poids sec de tourbe a donné une suspension de tourbe qui a pu être agitée (8)] en utilisant un dispositif d'homogénéisation haute performance.

Le pH de cette suspension est ajusté à 5,5 ± 0,5 avec $CaCO_3$. La suspension est conditionnée durant au moins deux jours sous agitation douce à 20 ± 2 °C, afin de stabiliser le pH et d'établir une composante microbienne stable. Le pH est de nouveau mesuré et ajusté à 6,0 ± 0,5 avec $CaCO_3$ si nécessaire. Ensuite l'ensemble de la suspension est mélangé aux autres constituants secs, en prenant en compte l'éventuelle part utilisée pour l'enrichissement. L'eau déionisée restante est ajoutée afin d'obtenir un sédiment homogène. Le pH est de nouveau mesuré et ajusté à 6,5 à 7,5 avec $CaCO_3$ si nécessaire. Toutefois, si on s'attend à un dégagement d'ammoniac, il peut être utile de conserver le pH du sédiment inférieur à 7,0 (p. ex. entre 6,0 et 6,5). Des échantillons du sédiment sont prélevés afin d'en déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique. Si on s'attend à un dégagement d'ammoniac, le sédiment artificiel peut être conditionné durant sept jours dans les conditions des essais à venir (p. ex. rapport sédiment:eau de 1:4, hauteur de la couche de sédiment comme dans les récipients d'essai) avant enrichissement avec la substance d'essai, c.-à-d. il doit être recouvert d'eau, laquelle doit être aérée. À la fin de la période de conditionnement, l'eau surjacente devra être enlevée et éliminée. Des échantillons du sédiment sont prélevés afin de déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique total (p. ex. 3 échantillons).

▼M6

Après quoi, le sable de quartz enrichi est mélangé au sédiment pour chaque niveau de traitement, le sédiment est réparti dans les récipients d'essai d'expériences identiques et recouvert avec l'eau d'essai (p. ex. avec un rapport sédiment:eau de 1:4, une hauteur de la couche de sédiment comme dans les récipients d'essai). Les récipients sont ensuite incubés dans les conditions de l'essai à venir. Ceci définit le point de départ de la période d'équilibration. L'eau surjacente doit être aérée.

La source de nourriture choisie doit être ajoutée avant ou durant l'enrichissement du sédiment avec la substance d'essai. Elle peut être mélangée dès le départ à la suspension de tourbe (voir plus haut). Toutefois, il est possible d'éviter une dégradation excessive de la source de nourriture avant addition des organismes d'essai — p. ex. en cas de période d'équilibration longue — en réduisant autant que possible la durée entre l'addition des aliments et le début de l'exposition. Afin d'assurer que la nourriture est en contact suffisant avec le composé d'essai, la source de nourriture ne doit pas être mélangée avec le sédiment plus d'une journée après l'enrichissement du sédiment avec la substance d'essai. On peut faire une exception lorsque la durée de la période d'équilibration conduit à une dégradation microbienne excessive des aliments avant ajout des organismes d'essai. Des échantillons du sédiment sont prélevés afin de déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique total (p. ex. 3 échantillons de sédiment enrichis ou témoins).

Le poids sec des composants (tourbe, sable, kaolin) devrait être rapporté en g et en pourcentage du poids sec total.

Le volume d'eau devant être ajouté aux composants secs durant la préparation du sédiment devrait également être rapporté en pourcentage du poids total (p. ex. 100 % de poids sec + 46 % d'eau signifie qu'un poids sec de 1 000 g reçoit un total de 460 ml d'eau, ce qui conduit à 1 460 g de sédiment humide).

Stockage

Les constituants secs du sédiment artificiel peuvent être stockés dans un endroit frais, sec à température ambiante. Le sédiment humide préparé peut être stocké (uniquement pour un usage en culture) à 4 ± 2 °C à l'abri de la lumière durant 2 à 4 semaines à compter du jour de la préparation (8).

Un sédiment enrichi avec la substance d'essai devrait être utilisé immédiatement, sauf si des informations spécifient qu'il est possible de stocker ce sédiment sans affecter la toxicité et la biodisponibilité de la substance d'essai. Des échantillons de sédiment enrichi peuvent être stockés dans les conditions recommandées pour la substance d'essai donnée jusqu'à analyse.

▼M6

Appendice 6

Espèces oligochètes recommandées pour les essais de bioaccumulation

***Tubifex tubifex* (MÜLLER),Tubificidae, oligochaeta**

L'oligochète tubificidé (Tubificidae, Oligochaeta) *Tubifex tubifex* (Müller) vie dans les sédiments d'eau douce dans des tubes enduits de mucus. Les vers vivent dans ces tubes, la tête en bas, ingérant les particules de sédiment en utilisant les micro-organismes et les débris organiques associés. La portion postérieure ondule généralement dans l'eau surjacente pour permettre au ver de respirer. Bien que cette espèce se rencontre dans une grande variété de sédiments sur tout l'hémisphère nord, *Tubifex tubifex* affectionne particulièrement les grains fins (59). Les raisons de l'adéquation de cette espèce pour des essais écotoxicologiques sont décrites, par exemple, dans (8) (29) (31) (39) (60) (62) (63).

Méthodes de culture

Afin de disposer d'un nombre suffisant de *Tubifex tubifex* pour conduire les essais de bioaccumulation, les vers devront être conservés dans une culture de laboratoire permanente. Un système consistant en un sédiment artificiel basé sur le sol artificiel de la méthode d'essai C.8 (40) et une eau reconstituée conformément à la méthode d'essai C.1 est recommandé pour la culture de *T. tubifex* (8).

Des récipients en verre ou en acier inoxydable d'une hauteur de 12 à 20 cm peuvent être utilisés comme récipients de culture. Chaque récipient de culture est chargé d'une couche de sédiment artificiel humide préparé selon la description de l'Appendice 5. L'épaisseur de la couche de sédiment doit permettre aux vers d'adopter un comportement d'enfouissement naturel (au minimum 2 cm de profondeur pour *T. tubifex*). Une eau reconstituée est ajoutée au système. Opérer soigneusement afin de ne pas perturber le sédiment. Le volume d'eau est doucement aéré (p. ex. 2 bulles par seconde avec un air filtré à 0,45 μm) via une pipette pasteur placée 2 cm au-dessus de la surface du sédiment. La température de culture recommandée est de 20 ± 2 °C.

Les vers sont ajoutés au système de culture avec une charge maximum de 20 000 individus/m^2 de surface de sédiment. Une charge supérieure peut provoquer une réduction des vitesses de croissance et de reproduction (43).

Dans des cultures en sédiment artificiel, les vers doivent être nourris. Un régime alimentaire consistant en du poisson finement broyé, p. ex. du TetraMin®, peut servir de nutriment supplémentaire (8); Klerks 1994, communication personnelle. La fréquence de l'alimentation doit permettre une croissance et une reproduction suffisantes et doit maintenir au minimum l'accumulation d'ammoniaque et la croissance de champignons dans la culture. La nourriture peut être administrée deux fois par semaine (p. ex. à raison de 0,6 à 0,8 mg par cm^2 de surface sédimentaire). L'expérience a montré que l'utilisation de nourriture mise en suspension et homogénéisée dans de l'eau déionisée peut faciliter une distribution homogène de la nourriture sur la surface du sédiment, dans les récipients de culture.

Afin d'éviter l'accumulation d'ammoniaque, l'eau surjacente devrait être renouvelée en utilisant un système dynamique ou, manuellement, au moins une fois par semaine. Dans les cultures de réserve, le sédiment devrait être remplacé tous les trois mois.

Si seuls des vers adultes sont nécessaires, il est possible de réaliser l'échantillonnage des vers à partir de la culture en tamisant le sédiment de culture au travers d'un tamis de 1 mm. Pour conserver des cocons, il convient d'utiliser un tamis de 0,5 mm et pour les jeunes, un tamis de 0,25 mm. Une fois que le sédiment est passé au travers, les tamis peuvent être placés dans de l'eau reconstituée. Les vers quittent le tamis et peuvent ensuite être prélevés dans l'eau en utilisant une pince en acier souple ou une pipette dont l'extrémité a été adoucie à la flamme.

▼M6

Seuls des spécimens intacts et clairement identifiés de *Tubifex tubifex* [p. ex. (64)] sont utilisés pour démarrer l'essai ou de nouvelles cultures. Les vers malades ou blessés ainsi que les cocons infestés par une mycose doivent être éliminés.

Une culture synchronisée peut fournir des vers d'un âge spécifique à intervalles adaptés à la demande. De nouveaux récipients de culture sont mis en place aux intervalles voulus (p. ex. toutes les deux semaines), en démarrant avec des animaux d'âge connu (p. ex. des cocons). Dans les conditions de culture décrites ici, les vers sont adultes après 8 à 10 semaines. Les cultures peuvent être «récoltées» lorsque les vers ont formé de nouveaux cocons, p. ex. après dix semaines. Les adultes échantillonnés peuvent être utilisés pour les essais, et de nouvelles cultures peuvent être démarrées avec les cocons.

***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, oligochaeta**

Lumbriculus variegatus (Lumbriculidae, Oligochaeta) est également un habitant des sédiments d'eau douce présent partout sur terre et il est largement utilisé dans des essais écotoxicologiques. On peut trouver des informations sur la biologie, les conditions de culture et la sensibilité de l'espèce dans (1) (6) (9) (36). Il est également possible de cultiver *Lumbriculus variegatus* dans le sédiment artificiel recommandé pour *T. tubifex* conformément à (8) avec certaines limitations. Comme, dans la nature, *L. variegatus* préfère des sédiments plus grossiers que *T. tubifex* (59), les cultures de laboratoire avec le sédiment artificiel utilisé pour *T. tubifex* peuvent s'éteindre après 4 à 6 mois. L'expérience a montré que *L. variegatus* peut être conservé dans un substrat sableux (p. ex. du quartz, des graviers fins) dans un système dynamique, en utilisant une alimentation à base de poissons, durant plusieurs années sans renouvellement du substrat. Un avantage majeur de *L. variegatus* par rapport à d'autres espèces d'oligochètes est sa rapidité de reproduction, qui conduit à une augmentation rapide de la biomasse des populations cultivées en laboratoire (1) (6) (9) (10).

Méthodes de culture

Les conditions de culture pour *Lumbriculus variegatus* sont détaillées par Phipps et al. (1993) (10), Brunson et al. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Un bref résumé de ces conditions est donné ci-dessous.

Les vers peuvent être cultivés dans de grands aquariums (57 à 80 l) à 23 °C avec une photopériode de 16L:8D (100 à 1 000 lux) en utilisant une eau naturelle renouvelée quotidiennement (45 à 50 l par aquarium). Le substrat est préparé en découpant des serviettes en papier brun non blanchi en rubans, lesquels peuvent ensuite être mélangés à l'eau de culture durant quelques secondes pour donner de petits morceaux de substrat de papier. Ce substrat peut ensuite être utilisé directement dans les aquariums de culture de *Lumbriculus* en couvrant le fond du récipient, ou être stocké congelé dans de l'eau déionisée pour une utilisation ultérieure. Un substrat neuf dans le réservoir durera généralement environ deux mois.

Chaque culture de vers démarre avec 500 à 1 000 vers et est alimentée par 10 ml d'une suspension contenant 6 g d'un starter à base de truite, 3 fois par semaine, en conditions dynamiques. Les cultures statiques ou semi-statiques devraient être alimentées moins fréquemment afin d'éviter le développement de bactéries et de champignons. Le substrat de nourriture et de papier devrait être analysé en y recherchant les substances chimiques utilisées dans les essais de bioaccumulation.

Dans ces conditions, le nombre d'individus de la culture double généralement en environ 10 à 14 jours.

Lumbriculus variegatus peut être sorti des cultures p. ex. en transférant soit le substrat avec un filet à mailles fines, soit les organismes en utilisant une pipette de verre à grande ouverture (environ 5 mm de diamètre) dont l'extrémité a été adoucie à la flamme, vers un bécher indépendant. Si du substrat est transféré

▼M6

dans ce bécher, le bécher contenant des vers et du substrat est laissé une nuit dans des conditions dynamiques, ce qui permet d'évacuer le substrat du bécher, alors que les vers restent dans le fond du récipient. Ils peuvent ensuite être introduits dans des récipients de culture fraîchement préparés, ou traités pour l'essai comme cela est indiqué dans (1) et (6). Il conviendra d'éviter les blessures ou l'autotomie des vers, p. ex. en utilisant des pipettes dont les bords ont été adoucis à la flamme, ou des pinces en acier inoxydable pour la manipulation de ces vers.

Un problème critique lors de l'utilisation de *L. variegatus* dans des essais de bioaccumulation concerne son mode de reproduction (architomie suivie de morphallaxie). Cette reproduction asexuée conduit à deux fragments qui, pendant un certain temps, ne s'alimentent pas jusqu'à ce que la partie tête ou queue soit régénérée (p. ex. (36) (37)). Ceci signifie que l'absorption de sédiment et de contaminant par ingestion ne peut avoir lieu en continu chez *L. variegatus* comme chez les tubificidés, qui ne se reproduisent pas par fragmentation.

Par conséquent, une synchronisation doit être réalisée afin de minimiser une reproduction et une régénération non contrôlée, qui s'ensuivraient d'une variation importante des résultats des essais. Une telle variation peut survenir, lorsque certains individus, qui se sont fragmentés et par conséquent ne s'alimentent pas durant un certain temps, sont moins exposés à la substance d'essai que les autres individus, qui ne se sont pas fragmentés durant l'essai, p. ex. (38). 10 à 14 jours avant le début de l'exposition, les vers devraient être fragmentés artificiellement (synchronisation) (65). Il est préférable d'utiliser des grands vers, ne montrant, de préférence, pas de signes de fragmentation récente. Ces vers peuvent être placés sur une lame de verre dans une goutte d'eau de culture, et disséqués dans la région médiane du corps avec un scalpel. Il convient de veiller à ce que les extrémités postérieures soient de taille similaire. On doit ensuite laisser les extrémités postérieures régénérer de nouvelles têtes dans un récipient de culture contenant un substrat identique à celui utilisé dans la culture et de l'eau reconstituée, jusqu'au début de l'exposition. La régénération de nouvelles têtes est indiquée par l'enfouissement des vers synchronisés, dans le substrat (la présence des têtes régénérées peut être confirmée par inspection d'un sous échantillon représentatif au microscope binoculaire). Les organismes d'essai sont par la suite supposés être dans un état physiologique similaire. Ceci signifie que, lorsque de la régénération par morphollaxie survient chez des vers synchronisés en cours d'essai, virtuellement tous les animaux sont supposés être également exposés au sédiment enrichi. L'alimentation des vers synchronisés devrait être réalisée dès que les vers commencent à s'enfouir dans le substrat, ou 7 jours après dissection. Le régime alimentaire devra être comparable à celui des cultures classiques, mais il est recommandé d'alimenter les vers synchronisés avec la même source de nourriture que celle utilisée durant l'essai. Les vers devraient être conservés à la température de l'essai, soit 20 ± 2 °C. Après régénération, des vers complets, intacts, de taille similaire, nageant ou rampant activement lors d'une stimulation douce, devraient être utilisés pour l'essai. Il conviendra d'éviter les blessures ou l'autotomie des vers, p. ex. en utilisant des pipettes dont les bords ont été adoucis à la flamme, ou des pinces en acier inoxydable pour la manipulation de ces vers.

Lorsque *Lumbriculus variegatus* est utilisé pour les essais, du fait du mode de reproduction particulier de cette espèce, le nombre de vers devrait augmenter durant l'essai, si les conditions le permettent (6). Une absence de reproduction lors d'un essai de bioaccumulation avec *L. variegatus* devrait être relevée et prise en compte lors de l'interprétation des résultats.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubificidae, oligochaeta (non validé par des essais comparatifs interlaboratoires)**

On trouve *Branchiura sowerbyi* dans une variété de type de sédiment de réservoirs, de lacs, d'étangs et de rivières, initialement dans les régions tropicales. On peut également les trouver dans des zones d'eau chaude de l'hémisphère nord. Toutefois, ils sont plus abondants dans les sédiments de boue argileuse à forte

▼M6

teneur en matière organique. En outre, les vers vivent dans la couche de sédiment. Même l'extrémité postérieure des vers est généralement enfouie. Cette espèce est facilement identifiée par les filaments branchiaux sur la partie postérieure. Les adultes peuvent atteindre une longueur de 9 à 11 cm et un poids humide de 40 à 50 mg. Les vers ont un taux de reproduction élevé, avec un temps de doublement de la population inférieur à 2 semaines, dans les conditions de température et d'alimentation décrites ci-dessous [Aston et al., 1982, (65)]. *B. sowerbyi* a été utilisé à la fois dans des études de toxicité et de bioaccumulation (Marchese & Brinkhurst 1996, (31), Roghair et al. 1996, (67) respectivement).

Méthodes de culture

Un résumé des conditions de culture est donné ci-dessous pour *Branchiura sowerbyi* (fourni par Mercedes R. Marchese, INALI, Argentine, et Carla J. Roghair, RIVM, Pays-Bas).

Il n'existe pas une technique unique pour la culture des organismes d'essai. Il est possible de cultiver les organismes en utilisant un sédiment naturel non contaminé (31). L'expérience a montré qu'un milieu consistant en un sédiment naturel et du sable améliore l'état des vers par rapport au sédiment naturel pur (32) (67). Des béchers de 3 l contenant 1 500 ml de milieu sédiment/eau, consistant en 375 ml de sédiment naturel non contaminé (environ 10 % de carbone organique total; environ 17 % de particules fines ≤ 63 μm), 375 ml de sable propre (M32), et 750 ml d'eau reconstituée ou d'eau du robinet déchlorée peuvent être utilisés pour la culture (31) (32) (67). Il est également possible d'utiliser des serviettes en papier comme substrat de culture, mais la croissance de population est plus lente que dans un sédiment naturel. Dans des systèmes semi-statiques, la couche d'eau, dans le bécher, est lentement aérée, et l'eau surjacente doit être renouvelée chaque semaine.

Pour démarrer, chaque bécher contient 25 jeunes vers. Après deux mois, les grands vers sont prélevés dans le sédiment avec une pince et sont placés dans un nouveau bécher avec un milieu sédiment/eau fraîchement préparé. L'ancien bécher contient également des cocons et des jeunes vers. De cette manière, il est possible de récolter jusqu'à 400 jeunes vers par bécher. Des vers adultes peuvent être utilisés pour la reproduction durant au moins un an.

Les cultures devraient être maintenues à une température de 21 à 25 °C. Les variations de température devraient être maintenues entre ± 2 °C. Le temps nécessaire au développement embryonnaire à partir de la ponte d'un œuf jusqu'à ce que le jeune quitte le cocon est d'environ trois semaines à 25 °C. La production d'œufs obtenue par un vers survivant de *B. sowerbyi* s'est avérée être dans la plage de 6,36 (31) à 11,2 (30) dans la boue à 25 °C. Le nombre d'œufs par cocon va de 1,8 à 2,8 (66) (69) ou jusqu'à 8 (68).

L'oxygène dissous, la dureté de l'eau, la température et le pH devraient être mesurés chaque semaine. Une alimentation à base de poisson (p. ex. TetraMin®) peut être ajoutée en suspension deux ou trois fois par semaine ad libitum. Les vers peuvent également être nourris avec de la salade décongelée *ad libitum*.

Un avantage majeur de cette espèce est la biomasse individuelle élevée (jusqu'à 40 à 50 mg de poids humide par individu). Par conséquent, cette espèce peut être utilisée pour des essais de bioaccumulation de substances d'essai non radiomarquées. Elle peut être exposée dans les systèmes utilisés pour *T. tubifex* ou *L. variegatus* avec un unique individu par expérience (11). Le nombre d'expériences identiques devra toutefois être augmenté, à moins d'utiliser des chambres d'essai plus grandes (11). Par ailleurs, le critère de validité concernant le comportement fouisseur doit être ajusté pour cette espèce.

▼**M6**

BIBLIOGRAPHIE

(1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment- associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. Dans ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(2) Commission européenne (CE) (2003) Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I — IV. Office des publications officielles des Communautés européennes (Commission européenne), Luxembourg.

(3) OCDE (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OCDE Monographie No. 60. Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), Paris.

(4) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. et Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.

(5) Chapitre C.13 de la présente annexe — Bioconcentration: essai avec renouvellement continu sur les poissons.

(6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(7) Chapitre C.27 de la présente annexe — Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau-sédiment dopé.

(8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.

(9) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. et Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, Lumbriculus variegatus. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.

(10) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete Lumbriculus variegatus for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment- associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on «Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes», 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.

(13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. & Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a Thalassia seagrass ecosystem. Estuaries 13, 301-310.

▼**M6**

(14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim

(15) Landrum, P.F., Lee II, H., & Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1709-1725.

(16) Markwell, R.D., Connell, D.W. & Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. Wat. Res. 23, 1443-1450.

(17) Gabric, A.J., Connell, D.W. & Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24, 1225-1231.

(18) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. et Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29, 1501-1514.

(20) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publications de l'OCDE sur l'environnement, la santé et la sécurité, Série sur les essais et l'évaluation N° 23.

(21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.

(22) Chapitres suivants de la présente annexe:

Chapitre A.4 — Pression de vapeur

Chapitre A.5 — Tension superficielle

Chapitre A.6 — Solubilité dans l'eau

Chapitre A.8 — Coefficient de partage, méthode par agitation en flacon

Chapitre A.24 — Coefficient de partage, méthode HPLC

Chapitre C.7 — Dégradation — dégradation abiotique: hydrolyse en fonction du pH

Chapitre C.4 A-F — Détermination de la biodégradabilité «facile»

Chapitre C.19 — Estimation du coefficient d'adsorption (K_{oc}) sur le sol et les boues d'épuration par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Chapitre C.29 — Biodégradabilité facile — dégagement de CO_2 dans des flacons hermétiquement clos

(23) OCDE (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No. 3. OCDE, Paris.

(24) Antoine, M.D., Dewanathan, S. & Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. Microchem. J. 43, 165-172.

▼M6

(25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke & G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation — New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(26) Spacie, A. & Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

(27) Hawker, D.W. & Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22, 701-707.

(28) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P. and Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm Tubifex tubifex. Environ. Toxicol. Chem. 10, 1061-1072.

(30) Aston, R.J. & Milner, A.G.P. (1981). Conditions for the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. Aquaculture 26, 155-160.

(31) Marchese, M.R. & Brinkhurst, R.O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. Hydrobiologia 334, 163-168.

(32) Roghair, C.J. & Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719102027.

(33) Chapitre C.1 de la présente annexe: Toxicité aiguë vis-à-vis des poissons.

(34) OCDE (1992c). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques n0 210. Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie. OCDE, Paris.

(35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of Limnodrilus hofmeisteri using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.

(36) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(37) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 2196-2202.

(38) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

(39) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. Tubifex tubifex (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111-124.

▼**M6**

(40) Chapitre C.8 de la présente annexe: Toxicité pour les vers de terre.

(41) Environnement Canada (1995). Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité sur sédiments de contrôle dopé avec un produit toxique de référence. Série de la protection de l'environnement. Rapport SPE 1/RM/30.

(42) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod Pontoporeia hoyi. Environ. Sci. Toxicol. 23, 588-595.

(43) Poddubnaya, T.L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). In: R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (eds.): Aquatic Oligochaeta Biology, 175-184. Plenum Press, New York.

(44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391-94.

(45) Hooftman, R.N., van de Guchte, K. & Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.

(46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?. Chemosphere 32, 1897-1905.

(47) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with Lumbriculus variegatus. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.

(48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. & Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10, 1431-1436.

(49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985) Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography, 30, 1099-1105.

(50) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917.

(51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. & Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

(53) Zok, S., Görge, G., Kalsch, W. & Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (Brachydanio rerio). Sci. Total Environment 109/110, 411-421

(54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische — Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.

(55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries & Van Straalen, N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

(56) Van Brummelen, T.C. & Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod Porcellio scaber. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

▼**M6**

(57) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. & Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail Orchesella cincta. Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

(58) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.

(59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. Arch. Hydr. 63, 310-386.

(60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. Environ. Sci. Technol. 21, 785-790.

(61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 47-67.

(62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 69-78.

(63) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. N^{o}. 22.

(65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete Lumbriculus variegatus by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(66) Aston, R.J., Sadler, K. & Milner, A.G.P. (1982). The effect of temperature on the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. Aquaculture 29, 137-145.

(67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E. & Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge Chironomus riparius and the tubificid oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719101026.

(68) Aston, R.J. (1984). The culture of Branchiura sowerbyi (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. Aquaculture 40, 89-94.

(69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. & Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta, Tubificidae). Hydrobiologia, 278, 267-274.

▼M7

C.47. POISSON, ESSAI DE TOXICITÉ AUX PREMIERS STADES DE LA VIE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 210 (2013) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les essais effectués sur les poissons au cours des premiers stades de leur vie sont destinés à déterminer les effets létaux et sublétaux des produits chimiques sur les stades de développement des espèces étudiées. Ils fournissent des informations précieuses pour l'évaluation des effets létaux et sublétaux chroniques de tel ou tel produit chimique sur d'autres espèces de poisson.

2. La ligne directrice 210, basée sur une proposition du Royaume-Uni qui a été examinée lors d'une réunion d'experts de l'OCDE tenue à Medmenham (Royaume-Uni) en novembre 1988, a été mise à jour en 2013 pour rendre compte de l'expérience de son utilisation et des recommandations formulées lors d'un atelier de l'OCDE sur les essais de toxicité pour les poissons qui s'est tenu en septembre 2010 (1).

PRINCIPE DE L'ESSAI

3. Les poissons aux premiers stades de leur vie sont exposés à une série de concentrations du produit chimique testé dissout dans l'eau. Les conditions dynamiques sont privilégiées; à défaut, des conditions semi-statiques sont néanmoins acceptables. Pour de plus amples informations, le document d'orientation de l'OCDE sur les essais de toxicité aquatique des substances et mélanges «difficiles» devrait être consulté (2). Au début de l'essai, les œufs fécondés sont placés dans des enceintes d'essai; la durée de l'essai est variable selon les espèces, car elle est déterminée en fonction du temps nécessaire pour que les poissons témoins atteignent le stade juvénile. Les effets létaux et sublétaux sont évalués et comparés aux valeurs des témoins, en vue de déterminer la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et d'en déduire i) la concentration sans effet observé (CSEO) et/ou ii) la CE_x (par exemple CE_{10}, CE_{20}) à l'aide d'un modèle de régression pour estimer la concentration qui entraînerait une modification de x % de l'effet mesuré. Les concentrations expérimentales doivent couvrir la CE_x de façon à ce que la CE_x soit interpolée plutôt qu'extrapolée (voir les définitions à l'appendice 1).

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE D'ESSAI

4. Le produit chimique d'essai désigne le produit soumis à l'essai. La solubilité dans l'eau (voir chapitre A.6 de la présente annexe) et la pression de vapeur (voir chapitre A.4 de la présente annexe) du produit chimique testé doivent être connues et il faut pouvoir disposer, pour doser le produit chimique dans les solutions d'essai, d'une méthode d'analyse fiable dont la précision et le seuil de détection sont connus. Bien qu'ils ne soient pas nécessaires pour mener l'essai, les résultats d'un essai de toxicité aiguë (voir chapitres C.1 ou C.49 de la présente annexe), effectué de préférence sur les mêmes espèces que celles sélectionnées pour le présent essai, peuvent être une source d'information précieuse.

5. Si la méthode d'essai est utilisée pour tester un mélange, la composition de ce dernier devrait être déterminée dans la mesure du possible, p.ex. par l'identité chimique de ses constituants, leur présence et quantité, ainsi que leurs propriétés spécifiques (telles que mentionnées au paragraphe précédent). Avant d'utiliser la méthode d'essai pour tester un mélange à des fins réglementaires, il convient de vérifier si les résultats seront acceptables dans le cadre réglementaire imposé.

6. Les informations suivantes sont utiles: formule structurale, pureté du produit chimique, solubilité dans l'eau, stabilité dans l'eau et à la lumière, pK_a, $P_{o/e}$ et résultats d'un essai de biodégradabilité facile (chapitres C.4 ou C.29 de la présente annexe, par exemple).

▼M7

VALIDITÉ DE L'ESSAI

7. Pour garantir la validité d'un essai, les conditions suivantes doivent être satisfaites:

— la concentration d'oxygène dissous doit être > 60 % de la valeur de saturation en air tout au long de l'essai;

— à aucun moment au cours de l'essai, la température de l'eau ne doit varier de plus de ± 1,5 °C entre les différentes enceintes d'essai ou entre deux jours consécutifs, et elle doit être maintenue dans la gamme spécifiée pour l'espèce testée (appendice 2);

— le dosage analytique des concentrations expérimentales est obligatoire.

— le taux de survie des œufs fécondés et après éclosion dans les groupes témoins, y compris, s'il y a lieu, dans les témoins contenant le solvant, doit être supérieur ou égal aux valeurs limites définies à l'appendice 2.

8. En cas d'observation d'une légère déviation par rapport aux critères de validité, les conséquences doivent être considérées en fonction de la fiabilité des données, et ces considérations doivent être notées dans le rapport d'essai. Les effets sur la survie, l'éclosion ou la croissance observés dans l'enceinte témoin contenant le solvant, après comparaison avec le témoin négatif, doivent être notés dans le rapport et discutés dans le contexte de la fiabilité des données d'essai.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Enceintes d'essai

9. On peut utiliser tout récipient en verre, acier inoxydable ou autre matériau chimiquement inerte. Le silicone étant connu pour sa bonne capacité d'absorption des substances lipophiles, l'usage de tubes en silicone dans les essais dynamiques et celui de joints en silicone au contact de l'eau doivent être réduits au minimum par le choix d'aquariums en verre monoblocs, par exemple. Le récipient doit avoir des dimensions suffisantes pour permettre une croissance correcte dans l'enceinte témoin, le maintien de la concentration d'oxygène dissous (pour les espèces de petite taille, on utilisera, par exemple, un récipient d'une contenance de 7 L) et le respect du critère du taux de charge énoncé au paragraphe 19. Il est souhaitable de disposer les enceintes d'essai selon un schéma aléatoire, de préférence par bloc, chaque traitement étant représenté dans chaque bloc, plutôt que de façon complètement aléatoire. Les enceintes d'essai doivent être protégées de toute perturbation indésirable. Le système d'essai doit de préférence être préconditionné avec les concentrations du produit chimique testé sur une durée suffisamment longue, afin de démontrer la stabilité des concentrations d'exposition avant l'introduction des organismes d'essai.

Choix des espèces

10. Les espèces de poissons recommandées sont énumérées dans le tableau 1. Ceci n'exclut pas l'utilisation d'autres espèces, mais il se peut que la méthode d'essai nécessite d'être adaptée afin d'offrir des conditions d'essai convenables. Dans ce cas, il faut justifier le choix de l'espèce et exposer la méthode expérimentale.

Soin des poissons géniteurs

11. On pourra trouver à l'appendice 3 et dans les références citées (3) (4) (5) des détails sur la façon de maintenir les poissons géniteurs dans des conditions satisfaisantes.

Manipulation des œufs fécondés, des embryons et des larves

12. Au départ, les œufs fécondés, les embryons et les larves peuvent être exposés, à l'intérieur de la cuve principale, dans des récipients plus petits en verre ou en acier inoxydable pourvus de côtés ou d'extrémités constitués d'un filet

▼M7

permettant à la solution d'essai de traverser le récipient. Il est possible d'induire un écoulement non turbulent à travers ces petits récipients en les suspendant à un bras disposé de façon à déplacer le récipient verticalement mais en gardant toujours les organismes submergés. Les œufs fécondés des salmonidés peuvent être posés sur des supports ou des grilles ayant des ouvertures suffisantes pour permettre aux larves de passer au travers après l'éclosion.

13. Quand on utilise des récipients, des grilles ou des filets pour maintenir les œufs à l'intérieur de la cuve principale, ces dispositifs doivent être enlevés après l'éclosion des larves, conformément aux instructions données à l'appendice 3, sauf si ces filets sont destinés à empêcher les larves de s'échapper. En cas de transfert nécessaire des larves, il ne faut ni les exposer à l'air ni utiliser de filet pour les faire sortir des récipients contenant les œufs. Le moment de ce transfert varie avec l'espèce et doit être signalé dans le rapport. Toutefois, le transfert n'est pas toujours nécessaire.

Eau

14. On utilise une eau dans laquelle l'espèce soumise à l'essai présente des taux adéquats de croissance et de survie à long terme (voir appendice 4). Sa qualité doit demeurer constante pendant toute la durée de l'essai. Pour s'assurer que l'eau de dilution ne puisse pas influer sur le résultat de l'essai (par complexation du produit chimique d'essai, par exemple) ou avoir des effets néfastes sur la performance des poissons géniteurs, on prélèvera des échantillons à différents intervalles pour analyse. Le dosage des métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, etc.), des principaux anions et cations (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}, etc.), de l'ammoniac, des pesticides organochlorés résiduels totaux, du carbone organique total et des solides en suspension sera effectué tous les six mois, par exemple, pour une eau de dilution dont on sait que sa qualité est relativement constante. Si l'on sait que la qualité de l'eau est variable, on augmentera la fréquence des dosages selon la variabilité de la qualité de l'eau. Certaines caractéristiques chimiques requises pour une eau de dilution acceptable sont énumérées à l'appendice 4.

Solutions d'essai

15. Les essais dynamiques requièrent un système qui délivre et dilue en continu une solution mère du produit chimique testé (par exemple une pompe doseuse, un diluteur proportionnel, un système de saturation) afin d'obtenir une série de concentrations dans les enceintes d'essai. Pendant l'essai, on doit vérifier à intervalles réguliers le débit des solutions-mères et de l'eau de dilution; ceux-ci ne doivent pas varier de plus de 10 % pendant toute la durée de l'essai. Un débit équivalent à au moins cinq volumes d'enceintes d'essai par 24 heures s'est avéré adéquat (3). Toutefois, si le taux de charge indiqué au paragraphe 19 est respecté, on peut tolérer un débit plus faible, équivalant à 2 ou 3 volumes d'enceintes d'essai, pour empêcher l'évacuation trop rapide de la nourriture.

16. Les solutions d'essai sont ajustées à la concentration voulue par dilution d'une solution mère. La solution mère est, de préférence, préparée par simple mélange ou agitation du produit chimique testé dans l'eau de dilution par des moyens mécaniques (agitation et/ou ultrasons, par exemple). Des colonnes de saturation (colonnes de solubilité) ou des méthodes de dosage passif (6) peuvent être utilisées pour réaliser une solution mère de concentration adéquate. L'emploi d'un solvant véhicule n'est pas recommandé mais peut s'avérer nécessaire. Dans ce cas, il convient de réaliser en parallèle un témoin contenant la même concentration de solvant que les solutions d'essai; en d'autres termes, il est préférable que la concentration de solvant soit identique dans les solutions d'essai contenant les concentrations testées et dans le témoin solvant. Cela peut se révéler difficile techniquement avec certains systèmes de dilution; dans ce cas, la concentration de solvant du témoin solvant doit être égale à la concentration de solvant la plus élevée des solutions d'essai. Pour les substances difficiles à tester, il convient de consulter le document d'orientation de l'OCDE n° 23 sur les essais de toxicité aquatique des substances et mélanges «difficiles» (2). Si l'option du

▼M7

solvant est néanmoins retenue, le choix du solvant sera guidé par les propriétés chimiques du produit chimique testé concerné. Le document d'orientation de l'OCDE n° 23 recommande de ne pas dépasser une concentration de 100 µl/l. Pour éviter que le solvant puisse avoir une incidence sur les effets mesurés (7), il est recommandé de choisir une concentration aussi faible que possible.

17. Si l'on opte pour un essai semi-statique, on peut utiliser deux méthodes différentes de renouvellement du milieu. Soit on prépare de nouvelles solutions d'essai dans des récipients propres et on transfère avec précaution les œufs et les larves survivants dans les nouveaux récipients, soit on maintient les organismes d'essai dans les récipients expérimentaux tout en changeant une partie (au moins les deux tiers) de la solution d'essai/du témoin.

MODE OPÉRATOIRE

Conditions d'exposition

Durée

18. L'essai doit démarrer dès que possible après la fécondation des œufs, qui sont de préférence immergés dans les solutions d'essai avant que la division du blastodisque ne commence ou aussi tôt que possible après ce stade. La durée de l'essai dépendra de l'espèce utilisée. Certaines durées sont recommandées à l'appendice 2.

Charge

19. Le nombre d'œufs fécondés au début de l'essai doit être suffisant pour répondre aux critères statistiques. Les œufs doivent être répartis au hasard dans les différents groupes de traitement. Pour chaque concentration, on doit utiliser au moins 80 œufs, répartis de façon égale entre au moins quatre enceintes d'essai identiques. Le taux de charge (la biomasse par volume de solution d'essai) doit être suffisamment faible pour que la concentration d'oxygène dissous puisse être maintenue sans aération à au moins 60 % de la valeur de saturation en air durant les stades embryonnaire et larvaire. Dans le cas des essais dynamiques, un taux de charge n'excédant pas 0,5 g/l (poids humide) par 24 heures et ne dépassant pas 5 g/l de solution à tout moment a été recommandé (3).

Lumière et température

20. La photopériode et la température de l'eau doivent être adaptées à l'espèce testée (voir appendice 2).

Alimentation

21. La nourriture et l'alimentation sont des points critiques, et pour chaque stade de développement, il est primordial de fournir la nourriture appropriée à partir d'un moment déterminé et dans des quantités suffisantes pour que la croissance soit normale. L'alimentation doit être à peu près identique dans tous les réplicats à moins d'un ajustement tenant compte de la mortalité. Les aliments non consommés ainsi que les excréta doivent être retirés quand cela s'avère nécessaire afin d'éviter l'accumulation de déchets. Des régimes alimentaires détaillés sont proposés à l'appendice 3 mais, avec l'expérience, la nourriture et les régimes alimentaires sont continuellement améliorés afin d'augmenter le taux de survie et d'optimiser la croissance. Les petits crustacés vivants enrichissent l'environnement et devraient donc remplacer la nourriture congelée ou déshydratée ou bien compléter ce régime alimentaire, à condition qu'ils conviennent à l'espèce et au stade de développement concernés.

Concentrations d'essai

22. Normalement, cinq concentrations du produit chimique testé (quatre réplicats au minimum par concentration) espacées par un facteur constant ne dépassant pas 3.2 sont nécessaires. Il convient de prendre en considération les données disponibles sur la toxicité aiguë, obtenues de préférence à partir d'essais sur les mêmes espèces et/ou d'un essai de détermination de la plage de concentrations, devront être prises en considération (1) pour délimiter la gamme des concentrations d'essai. Cependant, toutes les sources d'informations devraient être prises en compte lors de la sélection des concentrations d'essai, y compris des données de substitution, des données issues d'essais de

▼M7

toxicité aiguës sur des embryons de poissons, etc. Un essai limite, ou un essai limite prolongé, impliquant moins de cinq concentrations comme l'essai proprement dit, peut être acceptable si l'on cherche à établir les CSEO de façon empirique uniquement. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. Il n'est pas nécessaire de tester les concentrations au-delà de la CL_{50} à 96 heures ou de 10 mg/l si la CL_{50} est supérieure à cette concentration.

Témoins

23. Outre la série de concentrations du produit chimique testé, il convient de réaliser un témoin contenant de l'eau de dilution et éventuellement, si nécessaire, un témoin contenant uniquement le solvant véhicule (voir paragraphe 16).

Fréquence des dosages analytiques et des mesures

24. Avant le début de la période d'exposition, le bon fonctionnement du système de distribution du produit chimique testé dans tous les réplicats doit être vérifié (par dosage des concentrations d'essai, par exemple). Les méthodes analytiques nécessaires doivent être établies, y compris une limite de quantification (LQ) appropriée et des connaissances suffisantes sur la stabilité du produit chimique testé dans le système d'essai. Pendant l'essai, le dosage des concentrations du produit chimique testé est effectué à intervalles réguliers, l'objectif étant de caractériser l'exposition. Il est nécessaire de faire au moins cinq dosages. Si l'on utilise un système dynamique, on procède au moins une fois par semaine à des dosages analytiques du produit chimique testé à raison d'un réplicat par concentration, en changeant systématiquement d'échantillon. Le fait de procéder à des dosages analytiques supplémentaires permet souvent d'améliorer la qualité des résultats. On peut s'avérer nécessaire de filtrer les échantillons (avec des pores de 0,45 µm, par exemple) ou de les centrifuger pour éliminer les particules en suspension et s'assurer que les dosages se réfèrent aux concentrations du produit chimique testé en solution vraie. Afin de réduire l'adsorption du produit chimique testé, les filtres doivent être saturés avant usage. Lorsque les concentrations ne sont pas maintenues dans un intervalle de 80-120 % de la concentration nominale, les concentrations effectives doivent être dosées et exprimées par rapport à la moyenne arithmétique des concentrations dans le cas des essais dynamiques [voir l'appendice 6 de la méthode d'essai C.20 pour le calcul de la moyenne arithmétique (8)], tandis qu'elles doivent être exprimées par rapport à la moyenne géométrique des concentrations mesurées dans le cas des essais semi-statiques; pour de plus amples informations, voir le chapitre 5 du document d'orientation de l'OCDE sur les essais de toxicité aquatique des substances et mélanges «difficiles» (2).

25. Pendant l'essai, il convient de mesurer l'oxygène dissous, le pH et la température mesurés dans tous les récipients d'essai au moins une fois par semaine; si nécessaire, la salinité et la dureté doivent quant à elles être mesurées au début et à la fin de l'essai. Il est préférable de surveiller la température en continu dans au moins une cuve d'essai.

Observations

26. **Stade du développement embryonnaire**: il convient de vérifier aussi précisément que possible le stade embryonnaire au début de l'exposition au produit chimique testé. Ceci peut se faire en utilisant un échantillon représentatif d'œufs convenablement conservés et rendus translucides.

27. **Éclosion et survie**: il convient d'observer et dénombrer les éclosions et les survivants au moins une fois par jour. Si l'on observe la présence de champignos sur les œufs au début du stade de développement embryonnaire (le 1er ou le 2^{e} jour de l'essai, par exemple), il faut compter et retirer les œufs en question. Les embryons, larves et juvéniles morts doivent être enlevés dès qu'ils sont repérés, car ils peuvent se décomposer rapidement et être mis brisés par les autres poissons. En retirant les individus morts, il convient d'être extrêmement attentif à ne pas endommager physiquement les œufs et les larves adjacents. Les signes létaux varient selon les espèces et les stades de développement. Par exemple:

▼M7

— pour les œufs fécondés: en particulier au début de leur cycle, une diminution marquée de la transparence et un changement de coloration, dus à la coagulation et/ou à la précipitation de protéines et conduisant à un aspect blanc opaque;

— pour les embryons, larves et juvéniles: immobilité et/ou absence de mouvement respiratoire et/ou absence de battement du cœur et/ou absence de réaction aux stimulations mécaniques.

28. **Apparence anormale**: il convient de noter le nombre de larves et de juvéniles présentant une anomalie corporelle, à des intervalles de temps adéquats qui dépendent de la durée de l'essai et de la nature de l'anomalie décrite. Notons que, chez les larves et les juvéniles, l'anormalité est un phénomène naturel pouvant toucher de l'ordre de plusieurs pour cent des individus dans le(s) témoin(s) de certaines espèces. En cas de malformations et donc d'apparence anormale telles que l'organisme est en état de souffrance considérable et irréversible, l'organisme peut être retiré de l'essai. Les animaux concernés doivent être euthanasiés et comptabilisés comme morts aux fins de l'analyse statistique ultérieure. Le développement embryonnaire normal a été décrit pour la plupart des espèces recommandées dans la présente méthode d'essai (9) (10) (11) (12).

29. **Comportement anormal**: des anomalies telles qu'une hyperventilation, une nage mal coordonnée et une immobilité ou un comportement alimentaire atypiques doivent être notées à des intervalles de temps adéquats, qui dépendent de la durée de l'expérience (une fois par jour pour les poissons d'eaux chaudes, par exemple). Ces effets, bien que difficiles à quantifier, peuvent, lorsqu'ils sont observés, contribuer à l'interprétation des résultats de mortalité.

30. **Poids**: à la fin de l'essai, tous les poissons ayant survécu dans chaque réplicat sont pesés (on note le nombre d'animaux présents dans le réplicat ainsi que le poids moyen par animal); il est préférable de noter le poids humide (poissons séchés par tamponnage), mais le poids sec peut également être consigné dans le rapport (13).

31. **Longueur**: à la fin de l'essai, les poissons sont mesurés. Il est recommandé de mesurer leur longueur totale, mais en cas de décomposition de la nageoire caudale ou d'érosion des nageoires, on peut utiliser la longueur standard. On utilisera la même méthode pour tous les poissons d'un essai donné. Les poissons peuvent être mesurés au moyen d'un pied à coulisse, d'un appareil photo numérique, d'un micromètre oculaire étalonné, etc. Les longueurs minimales types sont définies à l'appendice 2.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

32. Il est recommandé de s'assurer que le protocole d'essai et le test statistique sélectionné aient une puissance suffisante (80 % minimum) pour permettre de déceler les changements d'importance biologique concernant les critères d'évaluation de l'effet pour lesquels une CSEO doit être rapportée. Si une CE_x doit être rapportée, le protocole d'essai et le modèle de régression sélectionné doivent permettre l'estimation de la CE_x de telle sorte que (i) l'intervalle de confiance à 95 % rapporté pour la CE_x ne contienne pas zéro et ne soit pas trop large, (ii) l'intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne prévue à la CE_x ne contienne pas la moyenne des témoins, (iii) le modèle de régression ne présente pas un manque d'ajustement significatif aux données. L'une ou l'autre démarche nécessitent d'identifier la variation en pourcentage de chaque effet qu'il importe de déceler ou d'estimer. Le dispositif expérimental doit être conçu pour y parvenir. Lorsque les conditions de détermination de la CE_x décrites ci-dessus ne sont pas remplies, l'approche de type CSEO doit être utilisée. Il est peu probable que la même variation en pourcentage s'applique à tous les effets observés, et que l'on puisse concevoir une

▼M7

expérience réalisable qui remplisse ces critères pour tous les effets observés, aussi importe-t-il, lors de la conception de l'expérience, de se concentrer sur les effets à mesurer qui sont importants pour cette dernière. Des ordinogrammes d'analyse statistique et des orientations sur chaque démarche figurent aux appendices 5 et 6; ces outils aident au traitement des données et permettent de choisir le test ou modèle statistique le plus approprié.

33. Pour analyser les variations à l'intérieur de chaque ensemble de réplicats, il sera nécessaire d'utiliser l'analyse de la variance ou des méthodes avec tableau de contingence ainsi que des méthodes d'analyse statistique appropriées fondées sur cette analyse. Afin d'opérer des comparaisons multiples entre les résultats obtenus pour chaque concentration et ceux obtenus pour les témoins, le test de Jonckheere-Terpstra ou de Williams est recommandé pour les réponses continues; un test de Cochran-Armitage appliqué de façon régressive est recommandé pour les réponses quantales (tout ou rien) qui correspondent à une relation concentration-réponse monotone et sans preuve de variance extra-binomiale (14). En cas de variance extra-binomiale avérée, il est recommandé d'utiliser le test de Cochran-Armitage modifié par Rao-Scott (15) (16), le test de Williams, le test de Dunnett (après transformation arc-sinus de la racine carrée) ou le test de Jonckheere-Terpstra appliqué à l'échelle des réplicats. Si les données ne correspondent pas à une relation concentration-réponse monotone, il pourra être utile de recourir au test de Dunnett, de Dunn ou de Mann pour les réponses continues et au test exact de Fisher pour les réponses quantales (14) (17) (18). La vigilance s'impose lorsqu'on applique une méthode ou un modèle statistique afin de s'assurer que les exigences liées à la méthode ou au modèle sont satisfaites (exemple: la variabilité d'une enceinte à l'autre est estimée et prise en compte dans le protocole d'essai ainsi que dans le test ou modèle utilisé). La normalité des données doit être évaluée; l'appendice 5 indique quel traitement doit être réservé aux résidus d'une analyse de la variance (ANOVA). L'appendice 6 traite d'autres considérations relatives à la démarche de régression. Des transformations doivent être envisagées pour respecter les exigences d'un test statistique. Cependant, les transformations visant l'ajustement d'un modèle de régression demandent beaucoup de précaution, sachant que, par exemple, une modification de 25 % de la réponse non transformée ne correspond pas à une modification de 25 % d'une réponse transformée. Dans toutes les analyses, ce n'est pas le poisson mais l'enceinte d'essai qui est l'unité d'analyse et l'unité expérimentale, un fait que les tests paramétriques et la régression devraient faire apparaître (3) (14) (19) (20).

Rapport d'essai

34. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Produit chimique d'essai:

Substance mono-constituant

— apparence physique, hydrosolubilité, autres propriétés physico-chimiques;

— identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. (y compris la teneur en carbone organique, si cela se justifie).

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges:

— caractérisée, autant que possible par p.ex. l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence quantitative et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituents

Espèce utilisée:

— nom scientifique, souche, origine, méthode de collecte des œufs fécondés et manipulations ultérieures.

▼**M7**

Conditions d'essai:

— méthode utilisée: semi-statique ou dynamique, charge, etc.;

— photopériode;

— conception de l'essai: nombre d'enceintes d'essai et de réplicats, nombre d'œufs par réplicat, matériau et dimensions de l'enceinte d'essai (hauteur, largeur, volume), volume d'eau par enceinte d'essai, etc.;

— méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (l'agent de solubilisation et sa concentration doivent être indiqués, le cas échéant);

— méthode de dosage du produit chimique testé: pompes doseuses, systèmes de dilution, etc.;

— efficacité de récupération de la méthode et concentrations d'essai nominales, limite de quantification, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types dans les cuves d'essai, méthode analytique utilisée et données montrant que les mesures se réfèrent aux concentrations du produit chimique testé en solution vraie;

— caractéristiques de l'eau de dilution: pH, dureté, température, concentration d'oxygène dissous, teneur en chlore résiduel (si mesurée), carbone organique total (si mesuré), solides en suspension (si mesurés), salinité du milieu d'essai (si mesurée) et toute autre mesure effectuée;

— qualité de l'eau dans les cuves d'essai: pH, dureté, température et concentration d'oxygène dissous;

— informations détaillées sur l'alimentation: type(s) d'aliment, provenance, quantité donnée, fréquence, etc.

Les résultats sont notés individuellement (ou pour chaque réplicat) sous forme de moyenne et de coefficient de variation, s'il y a lieu, pour les effets suivants:

— preuve que les témoins répondent à la norme d'acceptabilité relative à la survie globale de l'espèce (appendice 2);

— données sur la mortalité à chaque stade (embryonnaire, larvaire et juvénile) et la mortalité cumulée;

— jours des éclosions, nombre quotidien d'œufs éclos, et fin des éclosions;

— nombre de poissons sains à la fin de l'essai;

— données sur la longueur (préciser s'il s'agit de la longueur standard ou totale) et le poids des animaux survivants;

— fréquence et description et nombre d'anomalies morphologiques, s'il y a lieu;

— fréquence et description et nombre d'effets sur le comportement, s'il y a lieu;

— approche utilisée pour l'analyse statistique (analyse de régression ou analyse de la variance) et le traitement des données (test ou modèle statistique utilisé);

— concentration sans effet observé (CSEO) pour chacune des réponses étudiées;

▼M7

— concentration minimale avec effet observé (à p = 0.05) (CMEO) pour chacune des réponses étudiées;

— CE_x pour chacune des réponses étudiées, le cas échéant, et intervalles de confiance (à 90 % ou 95 %), graphique du modèle ajusté utilisé pour calculer la CE_x, pente de la courbe concentration-réponse, formule du modèle de régression, estimation des paramètres du modèle et de leurs erreurs types.

Tout écart par rapport à la méthode d'essai.

Discussions des résultats, notamment concernant l'influence sur les résultats de l'essai d'un éventuel écart par rapport à la méthode d'essai.

Tableau 1

Espèces de poissons recommandées pour les essais

EAU DOUCE	HABITATS ESTUARIENS et MARINS
Oncorhynchus mykiss Truite arc-en-ciel	*Cyprinodon variegatus* Fondule tête de mouton
Pimephales promelas Tête-de-boule	*Menidia* sp. Capucette
Danio rerio Poisson-zèbre	
Oryzias latipes Medaka (japonais)	

BBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et l'évaluation, n° 171, OCDE, Paris.

(2) OCDE (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et l'évaluation, n° 23, OCDE, Paris.

(3) ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241-88, 26 pp.

(4) Brauhn, J.L. et R.A. Schoettger (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(5) Brungs, W.A. et B.R. Jones (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(6) Adolfsson-Erici, *et al*. (2012), A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests, Chemosphere 86, pp. 593-599.

(7) Hutchinson, T.H. *et al*. (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69-92.

(8) Chapitre C.20 de la présente annexe: *Daphnia magna*, essai de reproduction.

(9) Hansen, D.J. and P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (Cyprindon variegatus) for life-cycle toxicity tests, In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink), ASTM STP 634.

(10) Kimmel, H. B.*et al*. (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203:253–310.

▼**M7**

(11) Gonzalez-Doncel, M. *et al* (2005), A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthydae) Journal of Applied Ichthyology, 20:1–14.

(12) Devlin, E.W. *et al*. (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, Pimephales promelas Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C.

(13) Oris, J.T., S.C. Belanger, and A.J. Bailer, (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, Environmental Toxicology and Chemistry 31; 2, 370 — 376.

(14) OCDE (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et l'évaluation, n° 54, OCDE, Paris.

(15) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

(16) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

(17) Dunnett C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of Ameican Statistical Association, 50, 1096-1121.

(18) Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

(19) Rand, G.M. and S.R. Petrocelli (1985), Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, New York.

(20) McClave, J.T., J.H. Sullivan and J.G. Pearson (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼M7

Appendice 1

DÉFINITIONS

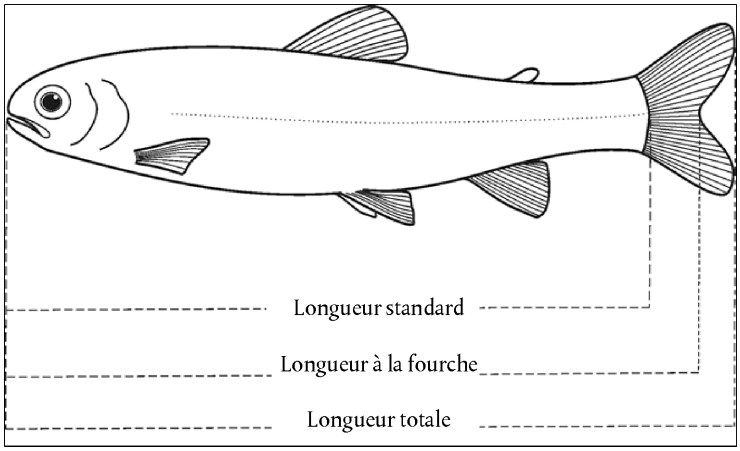
Longueur à la fourche (LF)*:* longueur mesurée de la pointe du museau à l'extrémité des rayons centraux de la nageoire caudale, utilisée pour les poissons pour lesquels il est difficile de savoir où se termine la colonne vertébrale (www.fishbase.org).

Longueur standard (LS)*:* longueur mesurée de la pointe du museau à l'extrémité postérieure de la dernière vertèbre ou à l'extrémité postérieure de la partie médio-latérale de la plaque hypurale. Autrement dit, cette mesure ne prend pas en compte la longueur de la nageoire caudale (www.fishbase.org).

Longueur totale (LE)*:* longueur de l'extrémité du museau à l'extrémité du lobe le plus long de la nageoire caudale, généralement mesurée après avoir comprimé les lobes le long de la ligne médiane. La mesure se fait en ligne droite, sans suivre la courbe du corps (www.fishbase.org).

Figure 1

Description des différentes longueurs utilisées



Produit chimique: une substance ou un mélange

CE_x (concentration efficace à x %): concentration qui engendre un effet de x % sur les organismes d'essai durant une période d'exposition déterminée, en comparaison avec un témoin. Par exemple, une CE_{50} est une concentration estimée produire un effet sur un paramètre évalué de l'essai dans 50 % d'une population exposée durant une période d'exposition déterminée.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): concentration la plus basse d'un produit chimique testé à laquelle on observe un effet statistiquement significatif (à $p < 0,05$) par rapport au témoin. Néanmoins, toutes les concentrations supérieures à la CMEO devraient avoir un effet néfaste supérieur ou égal à ceux observés à la CMEO. Lorsque ces deux conditions ne peuvent pas être remplies, il faut expliquer en détail la façon dont la CMEO (et donc la CSEO) a été choisie. Les appendices 5 et 6 donnent des indications à ce sujet.

Concentration (maximale) sans effet observé (CSEO): concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO qui, comparée au témoin, n'a pas d'effet statistiquement significatif (à $p < 0,05$), durant une période d'exposition définie.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai

UVCB: substances de composition inconnue ou variable, produits de réactions complexes ou matériels biologiques.

IUPAC: Union internationale pour la chimie pure et appliquée.

SMILES: Spécification d'écriture moléculaire linéaire simplifiée

▼M7

Appendice 2

CONDITIONS ET DURÉE DE L'ESSAI ET CRITÈRES DE SURVIE POUR LES ESPÈCES RECOMMANDÉES

ESPÈCE	CONDITIONS D'ESSAI			DURÉE D'ESSAI RECOMMANDÉE	Longueur totale moyenne minimale type des poissons témoins à la fin de l'essai (mm) (1)	TAUX DE SURVIE DES TÉMOINS (% minimum)	
	Température (ºC)	Salinité ($^0/_{00}$)	Photopériode (hrs)			À l'éclosion	Après l'éclosion
Eau douce:							
Oncorhynchus mykiss Truite arc-en-ciel	10 ± 1,5 (2)		12 - 16 (3)	2 semaines après alimentation *ad libitum* des témoins (ou 60 jours après l'éclosion)	40	75 %	75 %
Pimephales promelas Tête-de-boule	25 ± 1,5		16	32 jours à compter du début de l'essai (ou 28 jours après l'éclosion)	18	70 %	75 %
Danio rerio Poisson-zèbre	26 ± 1,5		12 - 16 (4)	30 jours après l'éclosion	11	70 %	75 %
Oryzias latipes Medaka (japonais)	25 ± 2		12 - 16 (4)	30 jours après l'éclosion	17	80 %	80 %
Habitats estuarins and marins:							
Cyprinodon variegatus Fondule tête de mouton	25 ± 1,5	15-35 (5)	12 - 16 (4)	32 jours à compter du début de l'essai (ou 28 jours après l'éclosion)	17	75 %	80 %
Menidia sp. Capucette	22 - 25	15-35 (5)	13	28 jours	20	80 %	60 %

La longueur totale moyenne minimale type ne constitue pas un critère de validité, mais les résultats inférieurs au chiffre indiqué doivent être examinés soigneusement par rapport à la sensibilité de l'essai.

(1) La longueur totale moyenne minimale est obtenue à partir d'une sélection de données disponibles à l'heure actuelle.
(2) La souche particulière de truite arc-en-ciel étudiée peut nécessiter l'utilisation d'autres températures. Les poissons géniteurs doivent être maintenus à la même température que celle devant être utilisée pour les œufs. Après réception d'œufs du commerce, une adaptation de courte durée (1- 2 h, par exemple) à la température d'essai est nécessaire après leur arrivée.
(3) Obscurité pour les larves jusqu'à une semaine après l'éclosion sauf lors de leur inspection, puis éclairage tamisé pendant toute la durée de l'essai (photopériode de 12-16 heures)(4).
(4) Quelles que soient les conditions d'essai, les conditions d'éclairage doivent être constantes
(5) Quel que soit l'essai, elle ne doit pas varier de plus de ±2$^0/_{00}$.

▼M7

Appendice 3

ORIENTATIONS EN MATIÈRE D'ALIMENTATION ET DE MANIPULATION DES POISSONS-GÉNITEURS ET DES POISSONS D'ESSAI ISSUS DES ESPÈCES RECOMMANDÉES

ESPÈCE	NOURRITURE (*)				MOMENT DU TRANSFERT APRÈS L'ÉCLOSION	MOMENT DE LA PREMIÈRE PRISE DE NOURRITURE
	Poissons-géniteurs	Larves nouvellement écloses	Juveniles			
			Type	Fréquence		
Eau douce:						
Oncorhynchus mykiss Truite arc-en-ciel	Nourriture pour truites	Aucune ([a])	Nourriture de base pour truites NA	2-4 fois par jour	14-16 jours après l'éclosion ou à la remontée (facultatif)	19 jours après l'éclosion ou à la remontée
Pimephales promelas Tête-de-boule	NA, flocons, AC	NA	NA48, flocons	2-3 fois par jour	À partir de 90 % d'éclosion	2 jours après l'éclosion
Danio rerio Posson-zèbre	NA, flocons	Larves disponibles dans le commerce, protozoaires ([b]), protéines ([c])	NA48, flocons	NA une fois par jour; flocons deux fois par jour	À partir de 90 % d'éclosion	2 jours après l'éclosion
Oryzias latipes Medaka (japonais)	flocons	NA, flocons (ou protozoaires ou rotifères)	NA48, flocons (ou rotifères)	NA une fois par jour; flocons deux fois par jour ou flocons et rotifères une fois par jour	Sans objet	6-7 jours après le frai
Habitats estuarins and marins:						
Cyprinodon variegatus Fondule tête de mouton	NA, flocons, AC	NA	NA48	2-3 fois par jour	Sans objet	1 jour après l'éclosion /la remontée
***Menidia* sp.** Silverside	NA48, flocons	NA	NA48	2-3 fois par jour	Sans objet	1 jour après l'éclosion /la remontée

(*) La nourriture doit être donnée à satiété. Le surplus et les excréta doivent être retirés quand cela s'avère nécessaire pour éviter l'accumulation de déchets.

AC artémies congelées; adultes du genre *Artemia*

NA nauplies d'artémies; fraîchement écloses

NA48 nauplies d'artémies; âgées de 48 h

([a]) les larves avec leur vitellus n'ont pas besoin de nourriture

([b]) filtrés à partir de cultures mélangées

([c]) granules provenant d'un processus de fermentation

▼M7

Appendice 4

QUELQUES CARACTERISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ADMISSIBLE

Paramètre	Concentration maximale
Particules	5 mg/l
Carbone organique total	2 mg/l
Ammoniac non ionisé	1 µg/l
Chlore résiduel	10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés	50 ng/l
Chlore organique total	25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arsenic	1 µg/l
Chrome	1 µg/l
Cobalt	1 µg/l
Cuivre	1 µg/l
Fer	1 µg/l
Plomb	1 µg/l
Nickel	1 µg/l
Zinc	1 µg/l
Cadmium	100 ng/l
Mercure	100 ng/l
Argent	100 ng/l

▼M7

Appendice 5

GUIDE D'ORIENTATION POUR L'ANALYSE STATISTIQUE DE LA DÉTERMINATION DE LA CSEO

Généralités

L'unité d'analyse est une série de réplicats. Ainsi, pour des mesures en continu telles que la taille, on calcule la moyenne ou la médiane des réplicats et les valeurs obtenues constituent les données destinées à l'analyse. La puissance des tests utilisés doit être démontrée, de préférence à partir une base de données historiques adéquate pour chaque laboratoire. L'ampleur de l'effet pouvant être détecté avec une puissance de 75-80 % doit être prévue pour chaque paramètre par le test statistique à utiliser.

Les bases de données disponibles au moment de l'élaboration de la présente méthode d'essai établissent la puissance possible selon les procédures statistiques recommandées. Le laboratoire doit démontrer sa capacité à répondre à cette exigence de puissance, soit en procédant à sa propre analyse de puissance, soit en démontrant que le coefficient de variation (CV) pour chaque réponse ne dépasse pas le 90^{e} percentile des CV utilisés pour développer la méthode d'essai. Le tableau 1 présente ces CV. Si l'on ne dispose que des moyennes et des médianes des réplicats, le CV intra-réplicats peut être ignoré.

Tableau 1

CV au 90^{e} percentile pour les espèces d'eau douce sélectionnées

Espèces	Réponse	CV_inter-réplicats	CV_intra-réplicats
Truite arc-en-ciel	Longueur	17,4	9,8
	Poids	10,1	28
Tête-de-boule	Longueur	16,9	13,5
	Poids	11,7	38,7
Poisson-zèbre	Longueur	43,7	11,7
	Poids	11,9	32,8

Pour la quasi-totalité des tests statistiques utilisés pour évaluer les études toxicologiques en laboratoire, les comparaisons intéressantes concernent les groupes de traitement par rapport aux témoins. Ainsi, il n'y a pas lieu d'exiger un test F ANOVA statistiquement significatif avant d'utiliser le test de Dunnett ou de Williams, ou un test statistiquement significatif de Kruskal-Wallis avant d'utiliser le test de Jonckheere-Terpstra, de Mann-Whitney ou de Dunn (Hochberg et Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson *et al.* 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

Le test de Dunnett permet des comparaisons multiples, et le fait d'utiliser le test F comme référence affecte négativement les taux de faux positifs et de faux négatifs. De même, le test de Williams et celui de Jonckheere-Terpstra utilisant un niveau de significativité de 0,05 à chaque étape conservent un taux global de faux positifs de 5 %, et ce taux ainsi que la puissance des tests sont affectés négativement par l'utilisation du test F ou du test de Kruskal-Wallis comme référence. Le test de Mann-Whitney et le test de Dunn doivent être corrigés aux fins de comparaison multiple et il est conseillé de leur appliquer une correction de Bonferroni-Holm.

On trouvera dans OCDE (2006) un examen approfondi de la plupart des recommandations sur les tests paramétriques et la vérification des hypothèses sous-jacentes à ces tests, ainsi qu'une bibliographie détaillée.

▼M7

Traitement des témoins en cas d'utilisation d'un solvant

Si l'on utilise un solvant, on doit prévoir un témoin-eau et un témoin-solvant. Les deux témoins doivent être comparés pour chaque réponse et combinés en vue de l'analyse statistique s'ils ne présentent aucune différence significative. Sinon, on doit utiliser le témoin-solvant pour le dosage de la CSEO ou l'estimation de la CE_x et ne pas utiliser le témoin-eau. Voir la restriction applicable aux critères de validité (paragraphe 7).

En ce qui concerne la longueur, le poids, la proportion d'œufs éclos, le taux de mortalité larvaire ou la proportion de larves anormales, et le premier ou le dernier jour de frai ou de remontée, un test T ou un test de Mann-Whitney doit être utilisé pour comparer les témoins au niveau de significativité de 0,05, en ignorant tous les groupes de traitement. Les résultats de ces tests doivent être notés dans le rapport.

Observations morphologiques (longueur et poids)

La longueur et le poids des poissons peuvent être distribués selon une loi normale ou log normale. Dans les deux cas, les valeurs moyennes par réplicat ont tendance à être normalement distribuées en vertu du théorème de la limite centrale et confirmées par les données provenant de plus d'une centaine d'études relatives aux stades de vie précoce de trois espèces d'eau douce. Par ailleurs, si les données ou les bases de données historiques font apparaître une distribution log normale en ce qui concerne les valeurs relatives à la taille des poissons, le logarithme des valeurs moyennes par réplicat peut être calculé, et les données pour l'analyse peuvent alors être les anti-logarithmes de ces logarithmes de moyennes par réplicat.

L'évaluation doit porter sur la compatibilité des données avec une distribution normale et une homogénéité de la variance. A cet effet, on utilisera les résidus d'un modèle ANOVA où la concentration est la seule variable explicative. On peut avoir recours à la représentation sous forme de nuages de points et d'histogrammes ou bien de diagrammes à tiges et à feuilles. Sinon, on peut utiliser un test formel comme celui de Shapiro-Wilk ou d'Anderson-Darling. Il est possible d'évaluer la compatibilité des données avec l'homogénéité de la variance par un examen visuel du même nuage de points ou formellement grâce au test de Levene. L'évaluation de la normalité et de l'homogénéité de la variance est obligatoire uniquement pour les tests paramétriques (Williams, Dunnett, etc.).

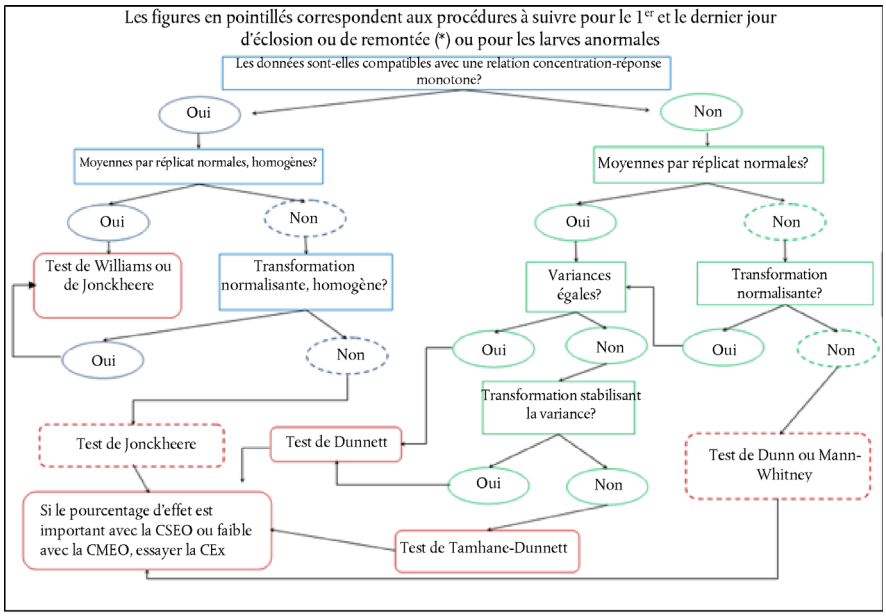
Une attention particulière doit être accordée aux éventuelles valeurs aberrantes et à leurs effets sur l'analyse. On peut avoir recours au test de Tukey et procéder à l'inspection visuelle des mêmes points de résidus décrits ci-dessus. Il convient de rappeler que les observations sont des réplicats entiers, de sorte que l'omission d'une aberration de l'analyse ne doit être effectuée qu'après un examen attentif.

Les tests statistiques qui font appel aux caractéristiques du protocole expérimental et de l'attente biologique sont des tests de tendance régressifs comme le test de Williams ou celui de Jonckheere-Terpstra. Ces tests supposent une relation concentration-réponse monotone, et il faut vérifier que les données sont compatibles avec cette hypothèse. Cela peut être fait visuellement à partir d'un nuage de points des moyennes par réplicat par rapport à la concentration d'essai. Il sera utile de superposer ce nuage de points avec un diagramme linéaire reliant les concentrations moyennes pondérées par la taille d'échantillonnage dans le réplicat. Un écart important de ce diagramme linéaire par rapport à la monotonie indiquerait qu'il faut peut-être avoir recours à des tests non paramétriques. Par ailleurs, il est possible d'avoir recours aux tests formels. Un test formel simple consiste à calculer les contrastes linéaires et quadratiques des moyennes de concentrations. Si le contraste quadratique est significatif et que le contraste linéaire ne l'est pas, cela indique qu'il peut y avoir un problème avec la monotonie, qui devra alors être évaluée à partir des points. S'il peut y avoir un problème avec la normalité ou l'homogénéité de la variance, ces contrastes pourront être construits à partir de données hiérarchisées. Il est possible d'utiliser d'autres tests, tels que le test de Bartholomew (pour la monotonie), mais ces tests accroissent la complexité.

▼M7

Figure 2

Logigramme pour la CSEO — observations morphologiques (longueur et poids)



(*) Ces réponses ne corroborent jamais les hypothèses en cas de modèles ou d'analyses paramétriques

À moins que les données ne soient pas conformes aux exigences des tests de Williams et de Jonckheere-Terpstra, on utilise ces tests pour déterminer la CSEO. On trouvera dans OCDE (2006) des informations détaillées sur ces procédures. Si les données sont non conformes aux exigences d'un test de tendance régressif, on peut utiliser le test de Dunnett ou celui de Tamhane-Dunnett (T3), qui permettent tous deux des comparaisons multiples. Ces tests supposent la normalité et, dans le cas du test de Dunnett, l'homogénéité de la variance. Si ces conditions ne sont pas remplies, on peut utiliser le test non paramétrique de Dunn. On trouvera dans OCDE (2006) des informations détaillées sur l'ensemble de ces tests. La figure 2 donne une vue d'ensemble permettant de choisir le test approprié.

Éclosion des oeufs et survie des larves

Les données à analyser sont les proportions d'œufs qui éclosent ou de larves qui survivent dans chaque réplicat. Ces proportions doivent être évaluées sous l'angle de la variance extra-binomiale, qui est fréquente mais pas universelle pour ces mesures. L'organigramme de la figure 3 donne des indications pour le choix du test approprié; le texte apporte des explications détaillées.

Deux tests sont couramment utilisés: celui de la C(α) de Tarone (Tarone, 1979) et des tests du Chi^2, chacun étant appliqué séparément à chaque concentration d'essai. En cas d'observation d'une variance extra-binomiale, même dans une seule concentration d'essai, les méthodes qui s'en accommodent doivent être utilisées.

Formule 1

test de la C(α) de Tarone (Tarone, 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^{m} \left(\frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1-\hat{p})} \right) - \sum_{j=1}^{m} n_j}{\left\{ 2 \sum_{j=1}^{m} n_j (n_j - 1) \right\}^{1/2}}$$

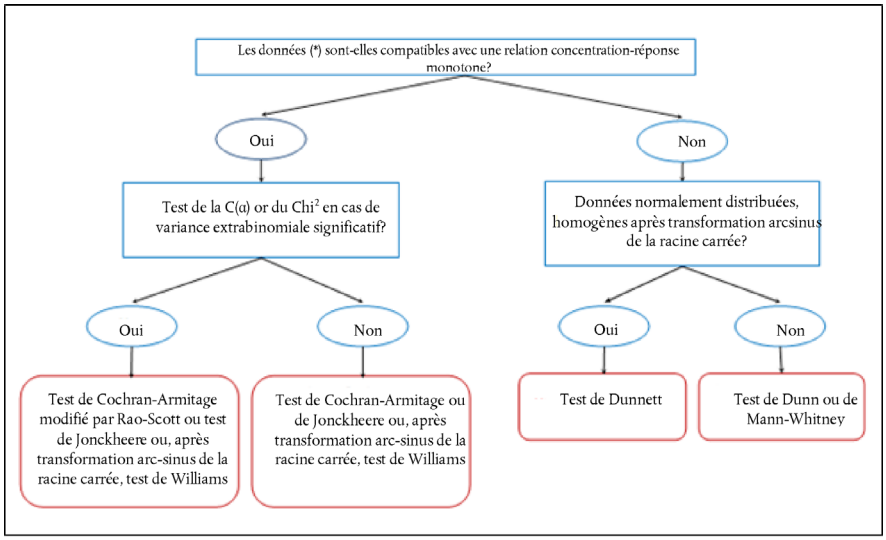
$\hat{p}$: proportion moyenne pour une concentration donnée; **m**: nombre de réplicats; $\mathbf{n_j}$: nombre de sujets présents dans le réplicat **j**; $\mathbf{x_j}$: nombre de sujets répondants

▼M7

dans le réplicat **j** (non éclos ou morts, par exemple). Ce test est appliqué à chaque concentration séparément. Il peut être considéré comme un test du Chi^2 corrigé, mais les simulations de faible puissance effectuées par Tarone ont montré qu'il était plus puissant qu'un test du Chi^2.

Figure 3

Logigramme pour la CSEO –éclosion des œufs et mortalité larvaire



(*) Les données à analyser sont les proportions dans chaque réplicat

En l'absence de preuve significative de la variance extra-binomiale, on peut utiliser le test de Cochran-Armitage. Ce test ne tenant pas compte des réplicats, il est recommandé d'utiliser l'ajustement Rao-Scott du test de Cochran-Armitage (RSCA), qui prend en compte les répétitions, la taille des réplicats et la variance extra-binomiale, s'il existe des preuves de cette dernière. On peut également utiliser le test de Williams, le test de Jonckheere-Terpstra ou le test de Dunnett, tels que décrits pour les observations morphologiques. Ces tests s'appliquent qu'il y ait ou non variance extra-binomiale, mais ont une puissance un peu plus faible (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao et Scott, 1992, 1999, Fung *et al.* 1994, 1996).

Premier ou dernier jour d'éclosion ou de remontée

La réponse est un nombre entier, indiquant le jour où l'observation indiquée est faite pour un réplicat donné. La plage de valeurs est généralement très limitée, et il y a souvent de fortes proportions de données liées; (par exemple, le premier jour d'éclosion est identique dans tous les témoins et éventuellement pour une ou deux faibles concentrations d'essai). Des tests paramétriques tels que le test de Williams et le test de Dunnett ne conviennent pas pour ce type de données. Sauf preuve sérieuse de non-monotonie, le test de Jonckheere-Terpstra est très puissant pour détecter les effets du produit chimique testé. Sinon, on peut utiliser le test de Dunn.

Malformations larvaires

La réponse est le nombre de larves plus ou moins atteintes de malformations. Cette réponse est souvent de faible incidence et pose certains des mêmes problèmes que le premier jour d'éclosion, avec une relation concentration-réponse parfois erratique. Si les données font apparaître une relation concentration-réponse globalement monotone, le test de Jonckheere-Terpstra est puissant pour détecter les effets. Sinon, on peut utiliser le test de Dunn.

▼**M7**

Bibliographie

Agresti, A. (2002); Categorical Data Analysis, second edition, Wiley, Hoboken.

Dunnett C. W. (1955); A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, J. American Statistical Association 50, 1096-1121.

Dunn O. J. (1964); Multiple Comparisons Using Rank Sums, Technometrics 6, 241-252.

Dunnett C. W. (1964); New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics 20, 482-491.

Fung, K.Y., D. Krewski, J.N.K. Rao, A.J. Scott (1994); Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, Risk Analysis 14, 639-648.

Fung, K.Y, D. Krewski, R.T. Smythe (1996); A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, Canadian Journal of Statistics 24, 431-454.

Hochberg, Y. and A. C. Tamhane (1987); Multiple Comparison Procedures, Wiley, New York.

Hsu, J.C. (1996); Multiple Comparisons: Theory and Methods; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere A. R. (1954); A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, Biometrika 41, 133.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

OCDE (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Série sur les essais et l'évaluation n° 54. Organisation de Coopération et de développement économiques, OCDE, Paris.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992) — A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1999) — A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

Robertson, T., Wright F.T. and Dykstra R.L. (1988); Order restricted statistical inference, Wiley.

Tarone, R.E. (1979); Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, Biometrika 66, 585-590.

Williams D.A. (1971); A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics 27, 103-117.

Williams D.A. (1972); The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics 28, 519-531.

Williams D. A. (1975); The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratotlogy, Biometrics 31, 949-952.

Williams D.A. (1977); Some inference procedures for monotonically ordered normal means, Biometrika 64, 9-14.

▼M7

Appendice 6

GUIDE D'ORIENTATION POUR L'ANALYSE STATISTIQUE DES ESTIMATIONS PAR RÉGRESSION

Généralités

Les observations utilisées pour ajuster un modèle sont les moyennes par réplicat (longueur et poids) ou les proportions d'œufs éclos et de larves mortes dans chaque réplicat (OCDE 2006).

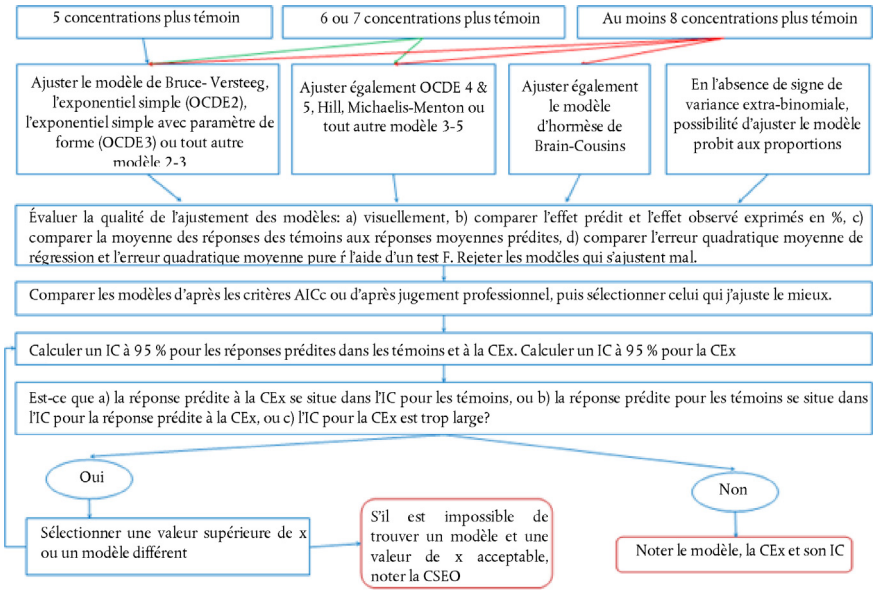
Il est généralement conseillé de procéder à une régression pondérée en utilisant pour ce faire la taille des échantillons réplicats. D'autres systèmes de pondération sont possibles (pondération en fonction de la réponse moyenne prédite ou bien combinaison de ce type de pondération et d'une pondération en fonction de la taille des échantillons réplicats, par exemple). En ce qui concerne les concentrations, la pondération en fonction de l'inverse de la variance dans l'échantillon à une concentration donnée n'est pas recommandée (Bunke *et al.* 1999, Seber et Wild 2003, Motulsky et Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

Toute transformation des réponses avant l'analyse doit préserver l'indépendance des observations; la CE_X et les limites de son intervalle de confiance doivent être exprimées dans les unités de mesure d'origine, plutôt que dans les unités transformées. Par exemple, une variation de 20 % du logarithme de la longueur n'équivaut pas à une variation de 20 % de la longueur (Lyles *et al.* 2008, Draper et Smith, 1999).

Le logigramme de la figure 4 donne un aperçu des estimations de la CE_X. Le texte y apporte des explications détaillées.

Figure 4

Logigramme pour l'estimation de la CEx pour la longueur, le poids, la proportion d'œufs éclos ou la mortalité larvaire moyennes par réplicat; consulter le texte pour de plus amples informations.



Considérations relatives aux éclosions et à la mortalité larvaire

En ce qui concerne les éclosions et la mortalité larvaire, il est généralement préférable d'ajuster un modèle décroissant, à moins d'ajuster un modèle probit comme décrit ci-dessous. Il convient donc de modéliser la proportion d'œufs qui n'éclosent pas ou de larves qui meurent. En effet la CEx renvoie à une concentration à laquelle la variation est égale à x % de la réponse moyenne des témoins. Si 5 % des œufs témoins ne parviennent pas à éclore et que l'on modélise l'incapacité à éclore, la CE_{20} désigne une concentration à laquelle il se produit une variation égale à 20 % des 5 % d'œufs témoins non éclos, soit une variation

▼M7

de 0,2 * 0.05 = 0,01 autrement dit d'1 point de pourcentage qui se traduit par un taux d'œufs non éclos de 6 %. Une variation aussi faible ne peut pas être estimée de façon significative à partir des données disponibles et n'est pas biologiquement importante. En revanche, si l'on modélisait la proportion d'œufs qui éclosent, la proportion parmi les témoins serait de 95 % dans notre exemple, et une réduction de 20 % par rapport à la moyenne des réponses des témoins se traduirait par une réduction de 0,95 * 0,2 = 0,18, soit un taux d'éclosion passant de 95 % à 77 % (= 95 – 18); la concentration produisant cet effet peut être estimée et revêt sans doute un plus grand intérêt. Le problème ne se pose par avec les mesurages se rapportant à la morphologie, bien que les conséquences négatives sur la morphologie correspondent généralement à une diminution de la taille.

Modèles concernant la morphologie (longueur ou poids) et le taux d'éclosion des œufs ou le taux de survie larvaire

Hormis le modèle d'hormèse de Brain-Cousens, tous ces modèles sont décrits et préconisés dans OCDE (2006). Les modèles OCDE 2-5 sont également discutés pour des expériences d'écotoxicité dans Slob (2002). Il existe bien entendu beaucoup d'autres modèles qui pourraient être utiles. Bunke *et al.* (1999) énumère de nombreux modèles ne figurant pas ici, et les références à d'autres modèles sont abondantes. Les modèles énumérés ci-dessous sont jugés particulièrement adaptés aux expériences d'écotoxicité et sont largement utilisés.

Avec 5 concentrations d'essai plus témoin

— Bruce-Versteeg

— exponentiel simple (OCDE 2)

— exponentiel avec paramètre de forme (OCDE 3)

— exponentiel simple avec limite inférieure (OCDE 4)

Avec minimum 6 concentrations d'essai plus témoin

— exponentiel avec paramètre de forme et limite inférieure (OCDE 5)

— Michaelis-Menten

— Hill

Lorsqu'il existe une preuve visuelle de l'hormèse (peu probable en cas de d'éclosion des œufs ou de survie larvaire, mais parfois observée sur le plan morphologique)

— modèle d'hormèse de Brain-Cousens; Brain et Cousens (1989)

Autres modèles pour les œufs non éclos et la mortalité larvaire

— De plus en plus de modèles applicables à ces réponses peuvent être adaptés par des modèles probit (ou logistiques) en l'absence de preuve de variance extra-binomiale; l'incidence du témoin est estimée dans l'ajustement du modèle. Cette méthode n'est pas à privilégier, car elle prend l'individu, et non le réplicat, comme unité d'analyse (Morgan 1992, O'Hara Hines et Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

Qualité de l'ajustement d'un modèle unique

— Comparer visuellement la diminution observée et la diminution prédite exprimées en pourcentage à chaque concentration d'essai (Motulsky et Christopoulos 2004, Draper et Smith, 1999).

— Comparer l'erreur quadratique moyenne de régression et l'erreur quadratique moyenne pure à l'aide d'un test F (Draper et Smith, 1999).

— Vérifier que chaque terme du modèle est significativement différent de zéro (autrement dit déterminer si tous les termes du modèle sont importants) (Motulsky et Christopoulos 2004).

▼M7

— Points de résidus de la régression par rapport à la concentration d'essai, éventuellement sur une échelle log(conc). Il ne doit y avoir aucun modèle pour ce graphique; les points doivent être dispersés au hasard sur une ligne horizontale à la hauteur zéro.

— Les données doivent être évaluées du point de vue de la normalité et de l'homogénéité de la variance comme indiqué à l'appendice 5.

— En outre, la normalité des résidus du modèle de régression doit être évaluée selon les mêmes méthodes indiquées à l'appendice 5 pour les résidus de l'ANOVA.

Comparaison des modèles

— Utiliser les critères AICc d'Akiake. Des valeurs AICc plus petites traduisent un meilleur ajustement, et si AICc (B)-AICc (A) ≥ 10, le modèle A est presque certainement meilleur que le modèle B (Motulsky et Christopoulos 2004).

— Comparer visuellement les deux modèles pour voir comment ils répondent aux critères du modèle unique ci-dessus.

— Le principe de parcimonie est conseillé, principe selon lequel on utilise le modèle le plus simple qui ajuste raisonnablement bien les données (Ratkowsky 1993, Lyles *et al.* 2008).

Qualité de l'estimation de la CE_x

L'intervalle de confiance (IC) de la CE_x ne doit pas être trop large. Le jugement statistique est nécessaire pour décider de la largeur de l'intervalle de confiance et de l'utilité que peut encore avoir la CE_x. Les simulations de modèles de régression ajustés aux données relatives à l'éclosion des œufs et aux données morphologiques montrent que 75 % environ des intervalles de confiance pour la CE_x (x = 10, 20 ou 30) ne portent pas sur plus de deux concentrations d'essai. Cela donne une idée de ce qui est acceptable et réalisable. De nombreux auteurs affirment qu'il faut indiquer les intervalles de confiance pour tous les paramètres du modèle et que lorsque les intervalles de confiance des paramètres du modèle sont grands, cela signifie que les modèles sont inacceptables (Ott et Longnecker 2008, Alvord et Rossio 1993, Motulsky et Christopoulos 2004, Lyles *et al.* 2008, Seber et Wild 2003, Bunke *et al.* 1999, Environnement Canada, 2005).

L'intervalle de confiance de la CE_x (ou de tout autre paramètre du modèle) ne doit pas contenir zéro (Motulsky et Christopoulos 2004). Il s'agit de la régression équivalente à la différence significative minimale qui est souvent citée dans les méthodes de vérification des hypothèses (Wang *et al.* 2000, par exemple). Il correspond également à l'intervalle de confiance pour que les réponses moyennes à la CMEO ne contiennent par la moyenne des réponses des témoins. Les estimations des paramètres sont-elles scientifiquement plausibles ? Par exemple, si l'intervalle de confiance pour y0 est ± 20 %, aucune estimation de la CE_{10} n'est plausible. Si le modèle prédit un effet de 20 % à une concentration C et si l'effet maximal observé à la concentration C et aux concentrations en-deçà est de 10 %, alors la CE_{20} n'est pas plausible (Motulsky et Christopoulos 2004, Wang *et al*. 2000, Environnement Canada, 2005).

La CE_x ne doit pas être extrapolée en dehors de la plage de concentrations positives (Draper et Smith 1999, OCDE 2006). Par exemple, un guide général pourrait être que la CE_x ne doit pas être inférieure de plus de 25 % environ à la concentration d'essai la plus faible ou supérieure supérieure de plus de 25 % à la concentration d'essai la plus élevée.

BIBLIOGRAPHIE

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, Journal of Immunological Methods 157, 155-163.

Brain P. and Cousens R. (1989); An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed res. 29: 93-96.

▼M7

Bunke, O., Droge, B. and Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197-240.

Collett, D. (2002); Modelling Binary Data, 2nde édition, Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003); Modelling Survival Data in Medical Research, 2nde édition, Chapman and Hall, London.

Draper, N.R. and Smith, H. (1999); Applied Regression Analysis, third edition. New York: John Wiley & Sons.

Environnement Canada (2005), Document d'orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité, SPE1/RM/46

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003); Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown, and C.R. Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. Novembre 2008; 29(6): 878–886.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

Motulsky, H., A. Christopoulos (2004); Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting, Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J. and J. F. Lawless (1993); Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time, *Biometrics* Vol. 49, pp. 107-121

OCDE (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application, Série de l'OCDE sur les essais et évaluations, no 54, pp. 1-147, ENV/JM/MONO(2006)18, OCDE, Paris.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, 6ème édition, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA

Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, Journal of Industrial Microbiology 12, 195-199.

Seber, G.A.F., C.J. Wild, Nonlinear Regression, Wiley, 2003

Slob W. (2002); Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66, 298-312

Wang, Q., D.L. Denton, and R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 19, pp. 113–117, 2000.

▼M7

C.48. ESSAI À COURT TERME DE REPRODUCTION DES POISSONS

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 229 (2012) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Le développement et la validation d'un essai sur les poisons, capable de détecter des produits chimiques agissant sur le système endocrinien, sont devenus nécessaires du fait des inquiétudes suscitées par la présence dans l'environnement de produits chimiques à des concentrations susceptibles d'avoir des effets néfastes sur l'homme et la faune sauvage. En 1998, l'OCDE a lancé une activité à caractère hautement prioritaire visant à réviser les Lignes directrices existantes et à élaborer de nouvelles Lignes directrices concernant le dépistage et l'essai d'éventuels perturbateurs endocriniens. L'un des volets de cette activité consistait à élaborer une ligne directrice pour le dépistage des produits chimiques agissant sur le système endocrinien des poissons. L'essai à court terme de reproduction des poissons a fait l'objet d'un programme de validation très complet comprenant des études inter-laboratoires portant sur une série de substances et visant à démontrer la pertinence et la fiabilité de l'essai pour la détection des produits chimiques affectant la reproduction chez les poissons par différents mécanismes, y compris des mécanismes endocriniens (1, 2, 3, 4, 5). La ligne directrice de l'OCDE découle des travaux de validation effectués sur le tête-de-boule (Pimephales promelas). Certaines observations mesurées ont également été validées sur le medaka japonais (Oryzias latipes) pour ce qui concerne la mesure de la vitellogénine et les caractères sexuels secondaires, et chez le poisson-zèbre (Danio rerio) en ce qui concerne la mesure de la vitellogénine. Ces travaux de validation ont été en partie revus par un comité composé d'experts désignés par les Coordinateurs nationaux du Programme sur les lignes directrices de l'OCDE (6), et aussi par un groupe d'experts indépendants commissionné par l'Agence de Protection de l'Environnement des États-Unis (29). Cet essai n'est pas conçu pour identifier les mécanismes spécifiques du dérèglement hormonal dans la mesure où les animaux d'essai possèdent un axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG) intact et sont en mesure de réagir aux produits chimiques ayant des effets sur l'axe HHG à différents niveaux.

2. La présente méthode d'essai décrit un essai de dépistage *in vivo* sur des groupes de poissons (composés de mâles sexuellement matures et de femelles reproductrices) exposés à une substance pendant une durée limitée de leur cycle biologique (21 jours). A l'issue de cette période d'exposition de 21 jours, deux biomarqueurs sont mesurés chez les mâles et les femelles pour servir d'indicateurs des effets de la substance d'essai sur le système endocrinien; ces biomarqueurs sont la vitellogénine (VTG) et les caractères sexuels secondaires. La vitellogénine est dosée chez le tête-de-boule, le medaka japonais et le poisson-zèbre tandis que les caractères sexuels secondaires sont mesurés chez le tête-de-boule et le medaka japonais. Pendant toute la durée de l'essai, la fécondité est en outre évaluée quotidiennement sur le plan quantitatif. Les gonades sont préservées et l'histopathologie gonadique peut être utilisée pour évaluer l'adaptation du système reproducteur des animaux testés et pour confirmer les éléments de preuve apportés par les autres biomarqueurs.

3. Ce bio-essai sert d'essai de dépistage *in vivo*, et son application est envisagée dans le contexte du «Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation de perturbateurs endocriniens» (30). Dans ce cadre conceptuel, l'essai de reproduction sur les poissons est proposé au niveau 3, en tant qu'essai *in vivo* fournissant des données sur certains mécanismes/certaines voies endocrinien(ne)s.

REMARQUES PRÉMIMINAIRES ET LIMITES

4. La vitellogénine (VTG) est normalement produite par le foie des femelles vertébrées ovipares en réponse à la circulation d'œstrogènes endogènes. Il s'agit d'un précurseur des protéines du vitellus, produit par le foie puis acheminé par le sang vers les ovaires, où il est capté et modifié par les ovocytes en croissance. La vitellogénine est quasiment indétectable dans le plasma des poissons mâles et femelles immatures, et ce en raison d'une présence insuffisante d'œstrogènes circulants; néanmoins, le foie peut synthétiser et secréter la vitellogénine en réponse à une stimulation œstrogénique exogène.

▼M7

5. Le dosage de la vitellogénine sert à détecter les produits chimiques ayant une action (anti-)œstrogénique. Cette détection peut se faire par la mesure de l'induction de vitellogénine chez les poissons mâles; elle a fait l'objet de nombreuses publications scientifiques dans des revues à comité de lecture (7, par exemple). L'induction de vitellogénine a également été démontrée suite à une exposition à des androgènes aromatisables (8, 9). La diminution du taux d'œstrogènes circulants chez les femelles sous l'effet, par exemple, de l'inhibition de l'aromatase, l'enzyme permettant de convertir l'androgène endogène en œstrogène naturel (17β-œstradiol), engendre une diminution du niveau de vitellogénine utilisée pour détecter les inhibiteurs d'aromatase (10, 11). La pertinence biologique de la réponse donnée par la vitellogénine suite à l'inhibition des œstrogènes/de l'aromatase est établie et a été abondamment étudiée. Néanmoins la production de VTG chez les femelles peut également être affectée par une toxicité générale et des modes d'action toxiques non-endocriniens (hépatotoxicité, par exemple).

6. Plusieurs méthodes de mesure ont été développées avec succès et normalisées en vue d'essais de routine. Ainsi, le test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) est un principe de reconnaissance immunologique couplé à une réaction enzymatique permettant de doser la vitellogénine à partir de prélèvements sanguins ou hépatiques effectués sur des poissons (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Les échantillons sont prélevés sur trois espèces: le tête-de-boule (sang), le poisson-zèbre (sang ou homogénat tête/queue) et le medaka (foie). Chez le medaka, il existe une bonne corrélation entre la concentration sanguine et la concentration hépatique de VTG (19). Les procédures recommandées pour les prélèvements effectués à des fins de dosage de la vitellogénine sont décrites à l'appendice 6. Des kits de dosage de la vitellogénine sont largement disponibles; ils sont fondés sur une méthode ELISA validée et spécifique de l'espèce testée.

7. Les caractères sexuels secondaires des poissons mâles de certaines espèces sont visibles à l'œil nu, quantifiables et réactifs aux taux d'androgènes endogènes circulants; c'est le cas pour le tête-de-boule et le medaka mais pas pour le poisson-zèbre, qui ne possède pas de caractères sexuels secondaires quantifiables. Les femelles conservent la capacité de développer des caractères sexuels secondaires masculins en cas d'exposition à des produits chimiques androgènes présents dans l'eau. Un certain nombre d'études scientifiques traitent de ce type de réponse chez le tête-de-boule (20) et le medaka (21). La dégénérescence des caractères sexuels secondaires chez les mâles est interprétée avec prudence en raison de leur faible puissance statistique. Par ailleurs, toute interprétation en la matière est fondée sur un jugement expert et sur l'analyse du poids de la preuve. L'utilisation du poisson-zèbre pour cet essai a ses limites compte tenu de l'absence, chez cette espèce, de caractères sexuels secondaires quantifiables, réactifs aux produits chimiques agissant sur les androgènes.

8. Chez le tête-de-boule, le nombre de tubercules nuptiaux situés sur le museau des femelles constitue le principal indicateur d'exposition à des androgènes exogènes. Chez le medaka femelle, le nombre de tubercules papillaires constitue le principal indicateur d'exposition à des produits chimiques androgènes. Les recommandations sur les procédures à suivre pour évaluer les caractères sexuels secondaires du tête-de-boule et du medaka figurent respectivement à l'appendice 5A et à l'appendice 5B.

9. L'essai de 21 jours sur les poissons permet aussi de mesurer de manière deux autres paramètres, à savoir la quantité d'œufs produite et, optionnellement, l'histopathologie gonadique. Certaines autorités réglementaires peuvent exiger l'histopathologie gonadique pour une évaluation plus complète de l'adaptation du système reproducteur des animaux d'expérience, ou dans les cas où la vitellogénine et les caractères sexuels secondaires n'ont pas répondu à l'exposition aux substances chimiques. Bien que certaines observations aient une valeur diagnostique élevée (p. exemple l'induction de la vitellogénine chez les poissons mâles ou la formation de tubercules chez les poissons femelles), toutes les observations rapportées de l'essai (p. exemple la fécondité ou l'histopathologie des gonades n'ont pas pour fonction d'identifier de manière non équivoque un mécanisme d'action cellulaire spécifique.

▼M7

Au contraire, la série d'observations de l'essai permet globalement de faire des déductions quant aux possibles perturbations endocriniennes, et donc d'orienter des tests à plus long terme. Malgré sa non-spécificité, la mesure de la fécondité est une observation importante dans l'essai étant donné la sensibilité démontrée vis-à-vis des produits chimiques actifs sur le système endocrinien (5). De plus, si la mesure de la fécondité, ainsi que les autres observations de l'essai ne sont pas affectées, il est plus aisé de conclure que la substance n'est probablement pas active sur le système endocrinien. Cependant le poids des preuves dans l'établissement des conclusions sera influencé si la mesure de la fécondité est affectée. Des orientations pour l'interprétation des données et l'acceptation des résultats d'essai seront données dans la suite de la présente méthode d'essai.

10. Les définitions utilisées dans la présente méthode d'essai sont présentées à appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

11. Lors de l'essai, des poissons mâles et femelles en état de se reproduire sont placés ensemble dans des récipients d'essai où ils sont exposés à des substances chimiques. Leur état d'adultes reproducteurs permet une différenciation claire entre les deux sexes, et donc une analyse des effets mesurés en fonction du sexe; il garantit également leur sensibilité aux substances exogènes. A la fin de l'essai, le sexe est confirmé par un examen macroscopique des gonades après incision de l'abdomen avec des ciseaux. Un tableau récapitulatif des conditions expérimentales pertinentes figure à l'appendice 2. Pour cet essai on sélectionne normalement des poissons en état de frayer; les animaux sénescents sont écartés. La section relative à la *sélection des poissons* donne des indications sur l'âge des poissons et sur leur état reproducteur. Trois concentrations d'essai ainsi qu'une cuve témoin contenant de l'eau sont utilisées. Un autre témoin contenant un solvant peut être utilisé si nécessaire. Deux cuves ou répliquats par traitement sont utilisées (chaque cuve contenant 5 mâles et 5 femelles) pour le poisson-zèbre; quatre récipients ou répliquats par traitement sont utilisées (chaque récipient comprenant 2 mâles et 4 femelles) pour le tête-de-boule. Ce principe permet de tenir compte du comportement territorial des têtes-de-boule mâles tout en maintenant la puissance de l'essai à un niveau suffisant. Quatre récipients ou répliquats par traitement sont utilisés pour médaka (chaque récipient contenant 3 mâles et 3 femelles). La durée d'exposition est de 21 jours; le prélèvement des poissons est effectué le 21^{e} jour. La fécondité est contrôlée quotidiennement sur le plan quantitatif.

12. Le 21^{e} jour, tous les poissons sont euthanasiés. Les caractères sexuels secondaires du tête-de-boule et du medaka sont évalués (cf. appendices 5A et 5B); des prélèvements sanguins sont effectués pour le dosage de la vitellogénine chez le poisson-zèbre et le tête-de-boule, mais un homogénat tête/queue peut aussi être utilisé pour le dosage de la vitellogénine chez le poisson-zèbre (appendice 6); des prélèvements hépatiques sont effectués pour le dosage de la VTG chez le medaka (appendice 6); les gonades sont fixées *in situ* ou bien disséquées pour une évaluation histopathologique éventuelle (22).

CRITÈRES DE VALIDITÉ DE L'ESSAI

13. Pour que les résultats de l'essai soient acceptables, les conditions suivantes s'appliquent:

— La mortalité dans les récipients témoins (eau ou solvant) ne dépasse pas 10 pour cent à la fin de la période d'exposition;

— La concentration d'oxygène dissous est maintenue à 60 pour cent au moins de la valeur de la saturation en air (VSA) durant toute la période d'exposition;

— À aucun moment, durant toute la période d'exposition, la température de l'eau ne diffère pas de plus de ± 1,5 °C entre les récipients, et elle demeure à l'intérieur d'un intervalle de 2°C compris dans la plage de température indiquée pour l'espèce étudiée (appendice 2);

— Les données disponibles démontrent que la concentration du produit chimique d'essai en solution a été correctement maintenue dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées;

▼M7

— Les données disponibles démontrent que les poissons se reproduisent activement dans tous les répliquats avant le début de l'exposition et dans les répliquats témoins pendant la durée de l'essai.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

14. On utilise du matériel courant de laboratoire et en particulier:

a. un pH-mètre et un appareil à mesurer l'oxygène;

b. un instrument pour mesurer la dureté et l'alcalinité de l'eau;

c. un dispositif adéquat de régulation de la température avec, de préférence, une surveillance en continu;

d. des récipients en matériau chimiquement inerte et d'une capacité adaptée à la charge et à la densité de peuplement recommandées (voir appendice 2);

e. un substrat de frai pour les têtes-de-boule et les poissons-zèbres (voir appendice 4);

f. une balance suffisamment précise (précision de ± 0,5mg).

Eau

15. On utilise une eau dans laquelle l'espèce testée présente des taux adéquats de croissance et de survie à long terme. Sa qualité demeure constante pendant la durée de l'essai. Le pH de l'eau est compris entre 6,5 et 8,5 sans varier de plus de ± 0,5 unité de pH au cours d'un même essai. Pour s'assurer que l'eau de dilution ne modifiera pas le résultat de l'essai (notamment par complexation du produit chimique d'essai), on prélève des échantillons à différents intervalles pour analyse. Le dosage des métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, etc.), des principaux anions et cations (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}, etc.), des pesticides (total des pesticides organophosphorés et organochlorés, etc.), du carbone organique total et des solides en suspension est effectué tous les trois mois, par exemple, pour une eau de dilution dont on sait que sa qualité est relativement constante. Si la qualité de l'eau s'est révélée constante durant au moins un an, on peut espacer les mesures (tous les six mois, par exemple). Certaines caractéristiques chimiques pour une eau de dilution acceptable sont énumérées à l'appendice 3.

Solutions d'essai

16. Des solutions d'essai sont ajustées à la concentration voulue par dilution d'une solution mère. La solution mère est, de préférence, préparée par simple mélange ou agitation du produit chimique d'essai dans l'eau de dilution par des moyens mécaniques (secouement ou ultrasons, par exemple). Des colonnes de saturation (colonnes de solubilité) peuvent être utilisées pour réaliser une solution mère de concentration adéquate. L'emploi d'un solavant véhicule n'est pas recommandé mais peut s'avérer nécessaire. Dans ce cas, il convient de réaliser en parallèle un témoin contenant la même concentration de solvant que les solutions d'essai. Pour les produits chimiques difficiles à tester, il convient de consulter le document d'orientation de l'OCDE sur les essais de toxicité aquatique des substances et mélanges «difficiles» (23). Le choix du solvant est déterminé par les propriétés chimiques de la substance ou du mélange. Le document d'orientation de l'OCDE recommande de ne pas dépasser une concentration maximale de 100µl/l. Toutefois une étude récente (24) a montré que l'utilisation de solvants lors des essais de substances ayant des effets sur le système endocrinien pouvait poser d'autres problèmes. Si l'utilisation d'un solvant s'avère nécessaire, il est donc recommandé de réduire sa concentration à un minimum dans toute la mesure des possibilités techniques (qui dépendent des propriétés physico-chimiques du produit chimique d'essai).

▼M7

17. On utilise un essai dynamique requérant un système qui délivre et dilue en continu une solution mère du produit chimique d'essai (pompe doseuse, dilueur proportionnel, système de saturation, par exemple) pour appliquer une série de concentrations dans les enceintes d'essai. Le débit des solutions mères et de l'eau de dilution est vérifié périodiquement, de préférence tous les jours, pendant la durée de l'essai et ne varie pas de plus de 10 % durant l'essai. Il convient de veiller à éviter l'utilisation de tubes en plastique de mauvaise qualité ou autres matériaux pouvant contenir des produits chimiques biologiquement actifs. Pour la sélection du matériel pour l'essai dynamique, il convient de prendre en considération l'adsorption possible du produit chimique d'essai sur le matériel.

Maintenance des poissons

18. Les poissons d'essai sont sélectionnés parmi une population de laboratoire, issue de préférence d'une même lignée, qui a été acclimatée pendant au moins deux semaines avant l'essai dans des conditions de qualité de l'eau et d'éclairage similaires à celles de l'essai. Il importe que le taux de charge et la densité de peuplement (voir les définitions à l'appendice 1) soient adaptés à l'espèce testée (voir appendice 2).

19. Après une période d'acclimatation de 48 heures, on note les mortalités et on applique les critères suivants:

— mortalité supérieure à 10 % de la population en sept jours: le lot entier est rejeté;

— mortalité comprise entre 5 et 10 % de la population: la période d'acclimatation est prolongée de sept jours; si la mortalité dépasse 5 % durant la deuxième période de 7 jours, le lot entier est rejeté;

— mortalité inférieure à 5 % de la population en sept jours: le lot est accepté.

20. Les poissons ne reçoivent pas de traitement pour maladie durant les périodes d'acclimatation, de pré-exposition et d'exposition.

Pré-expostion et sélection des poissons

21. Pendant la période de pré-exposition (une à deux semaines), les poissons sont placés dans des récipents similaires à ceux de l'essai. Il est préférable de nourrir les poissons *ad libitum* durant toute la période d'acclimatation et d'exposition. La période d'exposition débute avec des adultes sexuellement dimorphes issus d'une population de laboratoire d'animaux sexuellement matures (présentant, par exemple, des caractères sexuels secondaires visibles à l'œil nu en ce qui concerne le tête-de-boule et le medaka), se reproduisant activement. A titre d'orientation générale (ne devant pas être prise en considération indépendamment de l'observation de l'état reproducteur du lot entier), il convient que le poisson tête-de-boule soit âgé d'environ 20 (± 2) semaines, s'il a bénéficié d'une température de 25 ± 2°C pendant son élevage; que le medaka japonais soit âgé d'environ 16 (± 2) semaines, s'il a bénéficié d'une température de 25 ± 2°C pendant son élevage; et que le poisson-zèbre soit âgé d'environ 16 (± 2) semaines, s'il a bénéficié d'une température de 26 ± 2°C pendant son élevage. La fécondité est évaluée tous les jours durant toute la période de pré-exposition. Il est recommandé de mesurer et noter la fécondité dans tous les répliquats avant de commencer la phase d'exposition de l'essai en elle-même. Des instructions sur le nombre d'œufs produits quotidiennement ne peuvent pas être fournies à ce stade, mais il n'est pas rare d'avoir en moyenne .10 œufs/femelle/jour pour chaque espèce. Un dispositif d'essai permettant de disposer au hasard les répliquats en fonction des productions d'œufs pour les différents traitements sera préférée afin d'assurer une distribution équilibrée des répliquats.

▼M7

CONCEPTION DE L'ESSAI

22. Trois concentrations du produit chimique d'essai ainsi qu'un témoin (contenant de l'eau) sont utilisés. Un autre témoin contenant un solvant peut être utilisé si nécessaire. Les données peuvent faire l'objet d'analyses statistiques permettant de déceler les différences significatives entre les réponses correspondant à chaque niveau de concentration et au témoin. Plutôt que de servir à l'évaluation des risques, ces analyses sont utiles pour déterminer si le produit chimique doit faire l'objet de tests afin d'évaluer ses éventuels effets néfastes à plus long terme (survie, développement, croissance et reproduction) (25).

23. Pour le poisson-zèbre, des échantillons sont prélevés le 21ème jour dans les groupes traités à chaque niveau de concentration (chacun des deux répliquats comprenant 5 mâles et 5 femelles) et dans les témoins en vue du dosage de la vitellogénine. Pour le médaka, des échantillons sont prélevés le 21ème jour dans les groupes traités à chaque niveau de concentration (chacun des quatre répliquats comprenant 3 mâles et 3 femelles) et dans les témoins en vue du dosage de la vitellogénine et de l'évaluation des caractères sexuels secondaires. Pour les têtes-de-boule, des échantillons sont prélevés le 21ème jour dans les groupes traités à chaque niveau de concentration (chacun des quatre répliquats comprenant 2 mâles et 4 femelles) et dans les témoins en vue du dosage de la vitellogénine et de l'évaluation des caractères sexuels secondaires. L'évaluation quantitative de la fécondité est requise, et les tissus gonadiques sont fixés en entier ou disséqués pour une évaluation histopathologique éventuelle, s'il y a lieu.

Sélection des concentrations d'essai

24. Pour les besoins de l'essai, la concentration la plus forte est déterminée en fonction de la concentration maximale tolérée (CMT) obtenue à partir d'un essai préliminaire ou à partir d'autres données de toxicité, ou est fixée à 10 mg/l, ou encore est déterminée en fonction de la solubilité maximale dans l'eau, selon la valeur qui est la plus basse. La CMT est définie comme la concentration d'essai maximale de la substance engendrant un taux de mortalité inférieur à 10 %. L'utilisation de cette approche suppose l'existence de données empiriques sur la toxicité aiguë ou d'autres données de toxicité à partir desquelles la CMT pourra être estimée. L'estimation de la CMT peut être inexacte et requiert généralement un jugement expert.

25. Trois concentrations d'essai, espacées par un facteur constant ne dépassant pas 10, et un témoin contenant l'eau de dilution (plus, si nécessaire, un témoin solvant) sont nécessaires. Une gamme de facteurs d'espacement compris entre 3,2 et 10 est recommandée.

MODE OPÉRATOIRE

Sélection et pesée des poissons d'essai

26. Il importe de veiller à ce que le poids des poissons varie le moins possible au début de l'essai. L'appendice 2 indique les gammes de poids qui conviennent aux différentes espèces recommandées pour cet essai. Au début de l'essai, il convient si possible que la gamme des poids de l'ensemble des poissons mâles et femelles du lot utilisé ne sorte pas d'un intervalle de ± 20 % autour de la moyenne arithmétique de chaque sexe. On recommande de peser un sous-échantillon de poissons avant l'essai afin d'estimer le poids moyen.

Conditions d'exposition

Durée

27. La durée de l'essai est de 21 jours, après une période de pré-exposition. La durée de pré-exposition recommandée est de une à deux semaines.

Alimentation

28. Les poissons reçoivent *ad libitum* une nourriture appropriée (appendice 2) en quantité suffisante pour maintenir leur condition physique. Il convient de veiller à prévenir la prolifération de micro-organismes et la turbidité de

▼M7

l'eau. A titre d'indication générale, la ration quotidienne peut être divisée en deux ou trois parts égales administrées à trois heures d'intervalle au moins. Une seule ration plus conséquente est acceptable, notamment le week-end. Les poissons sont privés de nourriture pendant les 12 heures qui précèdent les prélèvements/l'autopsie.

29. Le dosage des contaminants [pesticides organochlorés, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), biphényles polychlorés (PCB)] est effectué dans la nourriture. Il convient d'éviter une nourriture présentant une forte concentration de phytœstrogènes qui compromettraient la réponse de l'essai à un agoniste œstrogénique connu (17β-œstradiol, par exemple).

30. Les aliments non consommés et les matières fécales sont retirés des récipients d'essai au moins deux fois par semaine, par un nettoyage soigneux du fond de chaque récipient d'essai à l'aide d'un siphon, par exemple.

Lumière et température

31. La photopériode et la température de l'eau sont adaptées à l'espèce testée (voir appendice 2).

Fréquence des dosages analytiques et des mesures

32. Avant le début de la période d'exposition, le bon fonctionnement du système de distribution de la substance est vérifié. Toutes les méthodes analytiques nécessaires sont établies, y compris des connaissances suffisantes sur la stabilité du produit chimique dans le système d'essai. Pendant l'essai, les concentrations du produit chimique d'essai sont déterminées à intervalles réguliers, en vérifiant de préférence chaque jour, mais à défaut au moins deux fois par semaine, le débit du diluant et celui de la solution mère de substance toxique. Il convient que ces débits ne varient pas de plus de 10 % pendant toute la durée de l'essai. Il est recommandé de mesurer les concentrations du produit chimique d'essai dans chaque récipient au début de l'essai puis chaque semaine.

33. Il est recommandé de fonder les résultats sur les concentrations mesurées. Toutefois, si la concentration du produit chimique d'essai en solution a été correctement maintenue tout au long de l'essai dans un intervalle de ± 20 % autour de la concentration nominale, les résultats peuvent être calculés à partir des valeurs nominales ou mesurées.

34. Il peut s'avérer utile de filtrer les échantillons (avec des pores de 0,45 μm, par exemple) ou de les centrifuger. Si elle est nécessaire, la centrifugation est la procédure recommandée. Cependant, si le matériel d'essai ne s'adsorbe pas sur le filtre, la filtration est également acceptable.

35. Pendant l'essai, l'oxygène dissous, la température et le pH sont mesurés dans tous les récipients d'essai au moins une fois par semaine. La dureté totale et l'alcalinité sont mesurées au moins une fois par semaine dans les récipients témoins et dans un récipient contenant la concentration la plus forte. Il est préférable de surveiller la température en continu dans au moins un récipient d'essai.

Observations

36. Un certain nombre de réponses biologiques générales (survie, par exemple) et ciblées par l'essai (niveaux de VTG, par exemple) sont évaluées au cours ou à la fin de l'essai. Le contrôle quantitatif de la fécondité peut être effectué quotidiennement si cela est requis par l'autorité réglementaire. La mesure et l'évaluation de ces biomarqueurs ainsi que leur utilité sont décrits dans la suite de la présente méthode d'essai.

Survie

37. Il convient d'examiner les poissons quotidiennement durant l'essai. Les décès sont notés et les poissons morts retirés dès que possible. Les poissons morts ne sont pas remplacés dans les récipients témoins ou les récipients contenant la substance. Le sexe des poissons morts durant l'essai est déterminé par observation macroscopique des gonades.

▼M7

Comportement et apparence

38. Tout comportement anormal (par rapport aux témoins) est noté, car il peut être un signe de toxicité générale (hyperventilation, nage non coordonnée, perte d'équilibre, immobilité ou alimentation atypiques). Il convient en outre de relever les éventuelles anomalies externes (hémorragie, décoloration, par exemple). La prudence s'impose lors de l'interprétation de ces signes de toxicité dans la mesure où ceux-ci peuvent révéler des concentrations auxquelles les biomarqueurs d'effets potentiels sur le système endocrinien ne sont pas fiables. Ces observations sur le comportement peuvent aussi fournir des informations qualitatives utiles pour les futures exigences potentielles en matière d'essais sur les poissons. On a ainsi pu observer une agressivité territoriale chez les têtes-de-boule mâles normaux ou chez les têtes-de-boule femelles masculinisées en cas d'exposition à des androgènes. Le comportement caractéristique d'accouplement et de reproduction du poisson-zèbre après les premières lueurs de l'aube est réduit ou entravé par l'exposition aux œstrogènes ou aux anti-androgènes.

39. La manipulation des poissons pouvant engendrer une modification rapide de certaines caractéristiques physiques (notamment la couleur), il importe de procéder aux observations qualitatives avant le retrait des poissons du système expérimental. Les expériences menées jusqu'à présent sur le tête-de-boule donnent à penser que certains perturbateurs endocriniens peuvent d'emblée avoir des effets sur les caractéristiques physiques suivantes: couleur (claire ou sombre), motifs de coloration (présence de bandes verticales) et forme du corps (région de la tête et région pectorale). Les observations relatives aux caractéristiques physiques des poissons sont donc notées au cours et à la fin de l'essai.

Fécondité

40. Des observations quantitatives quotidiennes relatives au frai seront consignées pour chaque répliquat. On notera la fécondité, à savoir le nombre d'œufs/femelle survivante/jour pour chaque répliquat. Les œufs seront retirés chaque jour des enceintes d'essai. Les substrats de frai sont placés dans l'enceinte d'essai pour le tête-de-boule et le poisson-zèbre, afin de permettre aux poissons de frayer normalement. On trouvera à l'appendice 4 des recommandations sur les substrats de frai pour les poissons-zèbres (appendice 4A) et les têtes-de-boule (appendice 4A). L'utilisation d'un substrat de frai pour le medaka n'est pas jugée utile.

Euthanasie des poissons

41. Le 21ème jour, c'est-à-dire à la fin de la période d'exposition, les poissons sont euthanasiés à l'aide de quantités de tricaïne appropriées [solution de 100-500 mg/l de méthanesulphonate de tricaïne (MS 222) (CAS.886-86-2) tamponnée avec 300 mg/l de $NaHCO_3$ (bicarbonate de sodium, CAS.144-55-8)] destinées à réduire l'irritation de la muqueuse; des prélèvements de sang et de tissus sont ensuite effectués pour le dosage de la VTG (voir la section sur la vitellogénine).

Observation des caractères sexuels secondaires

42. Certains perturbateurs endocriniens peuvent avoir des effets sur des caractères sexuels secondaires spécialisés (nombre de tubercules nuptiaux chez le tête-de-boule mâle et de tubercules papillaires chez le medaka mâle). Certaines substances peuvent notamment engendrer l'apparition anormale de caractères sexuels secondaires chez les animaux du sexe opposé. Ainsi les agonistes des récepteurs d'androgènes tels que le trenbolone, la méthyltestostérone et la dihydrotestostérone peuvent provoquer l'apparition de tubercules nuptiaux proéminents chez le tête-de-boule femelle et celle de tubercules papillaires chez le medaka femelle (20, 11, 21). On a pu noter également que les agonistes des récepteurs d'œstrogènes peuvent réduire le nombre de tubercules nuptiaux et la taille de l'amas graisseux situé sur la tête des adultes mâles pour l'espèce tête-de-boule (26, 27). Ces observations morphologiques macroscopiques peuvent fournir des informations qualitatives et quantitatives utiles pour fonder d'éventuelles exigences futures en matière d'essais sur les poissons. Le nombre et la taille des tubercules

▼M7

nuptiaux chez le tête-de-boule ainsi que ceux des tubercules papillaires chez le medaka peuvent être quantifiés directement, ou de manière plus pratique sur des spécimens préservés. Les recommandations sur les procédures applicables pour l'évaluation des caractères sexuels secondaires du tête-de-boule et du medaka figurent respectivement à l'appendice 5A et à l'appendice 5B.

Vitellogénine (VTG)

43. Un prélèvement sanguin est effectué dans l'artère / la veine caudale grâce à un tubule capillaire à microhématocrite héparinisé ou par ponction cardiaque avec une seringue. Selon la taille du poisson, les volumes sanguins prélevés sont généralement de 5 à 60 µl par individu pour les têtes-de-boule et de 5 à 15 µl par individu pour les poissons-zèbres. Le plasma est séparé du sang par centrifugation avant d'être stocké avec des inhibiteurs de protéase à – 80°C jusqu'à son analyse pour le dosage de la VTG. Chez le medaka, un prélèvement hépatique est utilisé; chez le poisson-zèbre, un homogénat tête/queue peut être utilisé comme échantillon tissulaire pour le dosage de la VTG (appendice 6). Le dosage de la VTG est effectué à l'aide d'une méthode ELISA homologue validée en utilisant des anticorps homologues et un standard de VTG homologue. Il est recommandé d'utiliser une méthode capable de détecter des concentrations de VTG de quelques ng/ml de plasma (ou ng/mg de tissus) seulement, correspondant à la concentration de fond chez les poissons mâles non exposés.

44. Le contrôle qualité de l'analyse de la VTG se fait par le biais de solutions-étalons, de blancs et, au minimum, d'analyses dédoublées. Pour chaque méthode ELISA, l'effet de matrice (effet de la dilution de l'échantillon) est testé afin de déterminer le facteur de dilution minimale de l'échantillon. Chaque plaque ELISA utilisée pour le dosage de la VTG comporte les échantillons de contrôle qualité suivants: au moins six solutions-étalons couvrant la plage des concentrations attendues de VTG, et au moins un blanc d'essai de liaison non spécifique (en analyse dédoublée). L'absorbance de ces blancs est inférieure à 5 % de l'absorbance maximale des solutions-étalons. Au moins deux aliquotes (puits dédoublés) de chaque dilution de l'échantillon sont analysés. Les puits dédoublés qui diffèrent de plus de 20 % font l'objet d'une nouvelle analyse.

45. Le coefficient de corrélation (R^2) des courbes d'étalonnage est supérieur à 0.99. Toutefois une corrélation élevée ne suffit pas à garantir la prédiction adéquate de la concentration pour toutes les plages de concentration. En plus d'obtenir une corrélation suffisamment élevée pour la courbe d'étalonnage, la concentration de chaque solution-étalon, calculée à partir de la courbe d'étalonnage, est comprise entre 70 et 120 % de sa concentration nominale. Si les concentrations nominales ont tendance à s'éloigner de la droite de régression de l'étalonnage (à des concentrations plus faibles, par exemple), il peut s'avérer nécessaire de partager la courbe d'étalonnage en deux plages, l'une forte et l'autre faible, ou d'utiliser un modèle non linéaire pour ajuster correctement les données relatives à l'absorbance. Si la courbe est partagée, il convient que les deux segments de droite aient un coefficient de corrélation $R^2 > 0.99$.

46. La limite de détection (LD) est définie comme la limite en deçà de laquelle la concentration est trop faible pour que la substance soit détectée, et la limite de quantification (LDQ) est définie comme la limite en deçà de laquelle la concentration est trop faible pour que la substance soit détectée, multipliée par le facteur de dilution le plus faible.

47. Chaque jour où des essais portant sur la VTG sont réalisés, un échantillon supplémenté obtenu à partir d'un étalon de référence inter-essais sera analysé (appendice 7). On notera alors systématiquement le rapport entre la concentration attendue et la concentration mesurée avec les résultats de chaque série d'essais effectuée ce jour-là.

Évaluation de l'histopathologie gonadique

48. L'histopathologie gonadique peut être demandée par les autorités réglementaires pour étudier l'organe récepteur de l'axe HHG après exposition à des substances chimiques. A ce propos, il est recommandé de fixer les gonades

▼M7

in situ ou bien de les disséquer. En cas de demande d'histopathologie, les réponses spécifiques du système endocrinien sur les gonades seront recherchées lors de l'évaluation des effets potentiels du produit chimique d'essai sur le système endocrinien. Ces réponses diagnostiques comprennent essentiellement la présence d'ovocytes testiculaires, une hyperplasie des cellules de Leydig, une diminution de la formation de vitellus, une augmentation de la spermatogonie et une hyperplasie perifolliculaire. D'autres lésions gonadiques comme une atrésie des ovocytes, une dégénérescence testiculaire et des changements de stade peuvent avoir diverses causes. Le document d'orientation sur l'histopathologie gonadique des poissons précise les procédures qui seront utilisées pour la dissection, la fixation, la coupe et l'évaluation histopathologique des gonades (22).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation de la réponse des biomarqueurs par l'analyse de la variance (ANOVA)

49. Pour identifier les effets potentiels d'une substance sur le système endocrinien, on compare les réponses des groupes traités et des groupes témoins en utilisant l'analyse de la variance (ANOVA). Si un témoin contenant un solvant est utilisé, une analyse statistique appropriée du témoin contenant l'eau de dilution et du témoin contenant le solvant est effectuée pour chaque effet observé. On trouvera dans le document de l'OCDE de 2006 sur les méthodes actuelles d'analyse statistique des données d'écotoxicité (28) des orientations sur le traitement des données relatives au témoin contenant l'eau de dilution et au témoin contenant le solvant lors de l'analyse statistique ultérieure. Les réponses biologiques obtenues sont analysées et notées séparément pour chaque sexe. Si les hypothèses requises concernant les méthodes paramétriques ne se vérifient pas — distribution non normale (par exemple test de Shapiro-Wilk) ou variance hétérogène (test de Bartlett ou de Levene) — il faudra envisager de transformer les données pour homogénéiser les variances avant de réaliser l'ANOVA ou de conduire une analyse pondérée de la variance. Le test de Dunnett (paramétrique) permettant de multiples comparaisons par paires ou le test de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni (non paramétrique) peuvent être utilisés pour une relation dose-réponse non monotone. D'autres tests statistiques peuvent être utilisés (test de Jonckheere-Terpstra ou de Williams) si la relation dose-réponse est approximativement monotone. Un ordinogramme d'analyse statistique figure à l'appendice 8. Cet outil d'aide à la décision permet de choisir le test statistique le plus approprié. Le document de l'OCDE sur les méthodes actuelles d'analyse statistique des données d'écotoxicité (28) fournit d'autres informations en la matière.

Rapport d'essai

50. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Installation d'essai:

— Personnel chargé de l'étude et responsabilités de chacun

— Chaque laboratoire a démontré sa compétence sur une gamme de substances chimiques représentatives

Produit chimique d'essai:

— Caractérisation du produit chimique d'essai

— Nature physique et propriétés physico-chimiques pertinentes

— Méthode et fréquence de préparation des concentrations d'essai

— Informations sur la stabilité et la biodégradabilité

Solvant:

— Caractérisation du solvant (nature, concentration utilisée)

— Justification du choix du solvant (si autre que l'eau)

▼**M7**

Animaux d'essai:

— Espèce et souche

— Fournisseur et équipements particuliers du fournisseur

— Âge des poissons au début de l'essai et état reproducteur

— Informations détaillées sur la procédure d'acclimatation des animaux

— Poids corporel des poissons au début de l'exposition (déterminé à partir d'un sous-échantillon issu de la population de poissons)

Conditions de l'essai:

— Méthode utilisée (type d'essai, taux de charge, densité de peuplement, etc.);

— Méthode de préparation des solutions mères et débit;

— Concentrations d'essai nominales, dosage hebdomadaire de la concentration des solutions d'essai et méthode analytique utilisée, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types dans les récipients d'essai et données montrant que les mesures se réfèrent aux concentrations du produit chimique d'essai en solution vraie;

— Caractéristiques de l'eau de dilution (pH, dureté, alcalinité, température, concentration d'oxygène dissous, teneurs résiduelles en chlore, carbone organique total, solides en suspension et toute autre mesure effectuée);

— Qualité de l'eau dans les récipients d'essai: pH, dureté, température et concentration d'oxygène dissous;

— Informations détaillées sur l'alimentation (par exemple type d'aliments, provenance, quantité donnée et fréquence) et analyse des contaminants pertinents (PCB, HAP et pesticides organochlorés, par exemple).

Résultats

— Données montrant que les témoins remplissent les critères de validité de l'essai;

— Données sur la mortalité pour chaque concentration d'essai et chaque témoin;

— Techniques d'analyse statistique appliquées, traitement des données et justification des méthodes utilisées;

— Données sur les observations biologiques de morphologie macroscopique, y compris les caractères sexuels secondaires, la fécondité et la VTG;

— Résultats des analyses de données, de préférence sous forme de tableaux et de graphiques;

— Fréquence des réactions inhabituelles des poissons et des effets visibles produits par le produit chimique d'essai

▼M7

ORIENTATIONS POUR L'INTERPRÉTATION ET L'ACCEPTATION DES RÉSULTATS DE L'ESSAI

51. Cette partie traite des paramètres à prendre en compte pour l'interprétation des résultats de l'essai en ce qui concerne les différents effets mesurés. Les résultats sont interprétés avec prudence lorsque le produit chimique d'essai semble provoquer des signes de toxicité manifestes ou avoir des effets sur l'état général de l'animal d'expérience.

52. Lors de la détermination préliminaire des concentrations d'essai, on veillera à ne pas dépasser la concentration maximale tolérée pour pouvoir interpréter les données de façon fiable. Il importe d'appliquer au moins un traitement qui ne provoque aucun signe d'effets toxiques. Les symptômes de maladie et les signes d'effets toxiques font l'objet d'une évaluation et d'un rapport détaillés. Il est possible, par exemple, que la production de VTG chez les femelles soit également affectée par une toxicité générale et des modes d'action toxiques non liés au système endocrinien (hépatotoxicité, par exemple). Toutefois l'interprétation des effets peut être renforcée par d'autres niveaux de traitement dont les effets ne sont pas perturbés par la toxicité systémique.

53. Quelques paramètres sont pris en compte pour l'acceptation des résultats de l'essai. A titre indicatif, les niveaux de VTG sont distincts chez les mâles et les femelles témoins, et séparés d'au moins trois ordres de grandeur chez le tête-de-boule et le poisson-zèbre et d'un ordre de grandeur chez le medaka. Des exemples de la gamme des valeurs relevées dans les groupes témoins et les groupes traités sont disponibles dans les rapports de validation (1, 2, 3, 4). Des valeurs élevées de VTG chez les mâles des groupes témoins peuvent compromettre la performance de l'essai et sa capacité de détection des agonistes des œstrogènes de faible puissance. Des valeurs de VTG basses chez les femelles témoins peuvent compromettre la performance de l'essai et sa capacité de détection des inhibiteurs de l'aromatase et des antagonistes des œstrogènes. Les études de validation ont été utilisées pour la rédaction de ces orientations.

54. La quantification du nombre d'œufs produits est sujette à d'importantes variations [le coefficient de variation (CV) peut être compris entre 20 et 60 %] qui peuvent avoir une incidence sur la capacité de l'essai à détecter une baisse significative de la production d'œufs inférieure à 70 % à mesure que le CV se rapproche de 50 % ou plus. Lorsque le CV est limité à des valeurs inférieures (de 20-30 %), l'essai aura une puissance statistique acceptable (80 %) pour détecter une baisse de 40-50 % de la production d'œufs. Le protocole d'essai utilisé pour le tête-de-boule, comprenant quatre répliquats par niveau de concentration, devrait conférer plus de puissance au critère de fécondité qu'un protocole comprenant seulement deux répliquats.

55. Si un laboratoire n'a pas procédé à cet essai auparavant ou s'il a procédé à des modifications substantielles (changement de souche ou de fournisseur de poissons, par exemple), il est conseillé de faire un essai pour vérifier la compétence technique. Il est recommandé d'utiliser des produits chimiques représentant une gamme de modes d'action ou d'impacts sur certains des paramètres mesurés durant l'essai. En pratique, chaque laboratoire est encouragé à constituer ses propres données de historiques témoins pour les mâles et les femelles, et à faire un essai avec un témoin positif de l'activité œstrogénique (par exemple, 17β-œstradiol à 100 ng/l, ou un agoniste faible connu) engendrant une augmentation de la VTG chez les mâles, un témoin positif de l'inhibition de l'aromatase (fadrozole ou prochloraze à 300 µg/l, par exemple) engendrant une diminution de la VTG chez les femelles, et un témoin positif de l'activité androgénique (17β-trenbolone à 5 µg/l, par exemple) engendrant l'induction de caractères sexuels secondaires chez les femelles tête-de-boule et medaka. Toutes ces données peuvent être comparées aux données disponibles issues des études de validation (1, 2, 3) pour garantir la compétence du laboratoire.

56. En général, les mesures de la VTG sont considérées comme positives en cas d'augmentation statistiquement significative de la VTG chez les mâles ($p<0,05$) ou de baisse statistiquement significative chez les femelles ($p<0,05$), et ce au moins à la concentration maximale soumise à l'essai par

▼M7

rapport au groupe témoin, et en l'absence de signes de toxicité générale. Un résultat positif est en outre confirmé par la démonstration d'une relation dose-réponse biologiquement plausible. Comme mentionné précédemment, la baisse de la VTG peut ne pas être entièrement liée au système endocrinien; toutefois un résultat positif est en général interprété comme un élément de preuve d'une activité du système endocrinien *in vivo*, et motive normalement des actions visant à une clarification plus poussée.

57. L'évaluation de l'histopathologie gonadique peut être requise par les autorités réglementaires pour déterminer l'aptitude reproductive des animaux d'essai et permettre d'évaluer les résultats de l'essai fondée sur le poids de la preuve. L'histopathologie gonadique peut ne pas être nécessaire lorsqu'un des effets mesurés ciblés par l'essai, à savoir la VTG ou les caractères sexuels secondaires, est positif (c'est-à-dire si l'on constate une augmentation ou une diminution de la VTG, ou l'apparition de caractères sexuels secondaires).

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement, Série sur les essais et l'évaluation n° 60, OCDE, Paris.

(2) OCDE (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement, Série sur les essais et l'évaluation n° 61, OCDE, Paris.

(3) OCDE (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement, Série sur les essais et l'évaluation n° 78, OCDE, Paris.

(4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (accessed 18/09/08).

(5) US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.

(6) OCDE (2008). Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement, Série sur les essais et l'évaluation n° 94, OCDE, Paris.

(7) Sumpter J.P., et S. Jobling (1995), Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives; 103 Suppl 7:173-8 Review.

(8) Pawlowski S., *et al.* (2004), Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.

(9) Andersen L., *et al.* (2006), Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

(10) Ankley G.T., *et autres* (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Toxicological Sciences; 67(1):121-30.

▼M7

(11) Panter G.H., *et al.* (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

(12) Parks L.G., *et al.* (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

(13) Panter G.H., *et al.* (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.

(14) Fenske M., *et al.* (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

(15) Holbech H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131

(16) Rose J., *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. C 131: 531-539.

(17) Brion F., *et al.* (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.

(18) Yokota H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87–98.

(19) Tatarazako N., *et al.* (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.

(20) Ankley G.T., *et al.* (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.

(21) Seki M, *et al.* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774-81.

(22) OCDE (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement, Série sur les essais et l'évaluation n° 123, OCDE, Paris.

(23) OCDE (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement, Série sur les essais et l'évaluation n° 23, OCDE, Paris

(24) Hutchinson T.H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

(25) Hutchinson T.H., *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as «signposts,» not «traffic lights,» in risk assessment. Environmental Health Perspectives; 114 Suppl 1:106-14.

▼**M7**

(26) Miles-Richardson S.R., *et al.* (1999). Effects of waterborne exposure to 17β-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Aquat. Toxicol. 47, 129-145.

(27) Martinovic D., *et al.* (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478-488.

(28) OCDE (2006c), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement, Série sur les essais et l'évaluation n° 54, OCDE, Paris.

(29) US EPA (2008), Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay, dated 30 January 2008, US Environmental Protection Agency, Washington DC. 110 pp.

(30) OCDE (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement, Série sur les essais et l'évaluation n° 150, OCDE, Paris.

▼**M7**

Appendice 1

ABRÉVIATIONS & DÉFINITIONS

Produit chimique: une substance ou un mélange

CV: coefficient de variation

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)*: procédé immunochimique d'absorption enzymatique

Axe HHG: axe hypothalamo-hypophyso-gonadique

Taux de charge: poids frais de poissons par unité de volume d'eau

CMT: concentration maximale tolérée représentant environ 10 % de la CL_{50}

Densité de peuplement: nombre de poissons par unité de volume d'eau

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'assai.

VTG: la vitellogénine est une lipo-glyco-phospho-protéine précurseur des protéines du vitellus normalement produite par les femelles sexuellement actives de toutes les espèces ovipares

▼M7

Appendice 2

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES DU PROTOCOLE DE DEPISTAGE DES SUBSTANCES AGISSANT SUR LE SYSTÈME ENDOCRINIEN DES POISSONS NON REPRODUCTEURS

1. Espèces recommandées	Tête-de-boule (*Pimephales promelas*)	Medaka (*Oryzias latipes*)	Zebrafish (*Danio rerio*)
2. Type d'essai	dynamique	dynamique	dynamique
3. Température de l'eau	25 ± 2°C	25 ± 2°C	26 ± 2°C
4. Qualité de l'éclairage	Ampoules fluorescentes (à large spectre)	Ampoules fluorescentes (à large spectre)	Ampoules fluorescentes (à large spectre)
5. Intensité de l'éclairage	10-20 µE/m^2/s, 540-1 000 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire)	10-20 µE/m^2/s, 540-1 000 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire)	10-20 µE/m^2/s, 540-1 000 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire)
6. Photopériode (transitions — aube et crépuscule — optionnelles, mais non considérées comme nécessaires)	16 h de lumière, 8 h d'obscurité	12-16 h de lumière, 12-8 h d'obscurité	12-16 h de lumière, 12-8 h d'obscurité
7. Taux de charge	<5 g/l	< 5 g/l	<5 g/l
8. Volume des enceintes d'essai	10 l (minimum)	2 l (minimum)	5 l (minimum)
9. Volume de la solution d'essai	8 l (minimum)	1,5 l (minimum)	4 l (minimum)
10. Remplacement volumique des solutions d'essai	Minimum 6 fois/jour	Minimum 5fois/jour	Minimum 5fois/jour
11. Âge des organismes d'essai	voir § 21	voir § 21	voir § 21
12. Poids frais approximatif des poissons adultes (g)	femelles: 1,5 ± 20 % mâles: 2,5 ± 20 %	femelles: 0,35 ± 20 % mâles: 0,35 ± 20 %	femelles: 0,65 ± 20 % mâles: 0,4 ± 20 %
13. Nombre de poissons par récipient	6 (2 mâles et 4 femelles)	6 (3 mâles et 3 femelles)	10 (5 mâles and 5 femelles)
14. Nombre de traitements	= 3 (plus témoins appropriés)	= 3 (plus témoins appropriés)	= 3 (plus témoins appropriés)
15. Nombre de récipient par traitement	4 minimum	4 minimum	2 minimum
16. Nombre de poissons par concentration d'essai	16 adultes femelles et 8 mâles (4 femelles et 2 mâles dans chaque répliquat)	12 adultes femelles et 12 mâles (3 femelles et 3 mâles dans chaque répliquat)	10 adultes femelles et 10 mâles (5 femelles et 5 mâles dans chaque répliquat)
17. Régime alimentaire	Artémies adultes ou nauplies d'artémies, vivantes ou congelées, deux ou trois fois par jour (*ad libitum*), nourriture disponible dans le commerce ou combinaison de ces éléments	Nauplies d'artémies deux ou trois fois par jour (*ad libitum*), nourriture disponible dans le commerce ou combinaison de ces éléments	Nauplies d'artémies deux ou trois fois par jour (*ad libitum*), nourriture disponible dans le commerce ou combinaison de ces éléments

▼M7

18. Aération	Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 60 % de la valeur de la saturation en air (VSA)	Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 60 % de la valeur de la saturation en air (VSA)	Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 60 % de la valeur de la saturation en air (VSA)
19. Eau de dilution	Eau de surface, de puits ou reconstituée, ou eau du robinet déchlorée	Eau de surface, de puits ou reconstituée, ou eau du robinet déchlorée	Eau de surface, de puits ou reconstituée, ou eau du robinet déchlorée
20. Période de pré-exposition	7-14 jours (recommandé)	7-14 jours (recommandé)	7-14 jours (recommandé)
21. Durée de l'exposition au produit chimique	21 jours	21 jours	21 jours
22. Effets biologiques mesurés	— survie — comportement — fécondité — caract. sexuels secondaires — VTG — histopathologie gonadique (optionnel)	— survie — comportement — fécondité — caract. sexuels secondaires — VTG — histopathologie gonadique (optionnel)	— survie — comportement — fécondité — VTG — histopathologie gonadique (optionnel)
23. Critères de validité de l'essai	Concentration d'oxygène dissous ≥ 60 % de la VSA; température moyenne de 25 ± 2°C; 90 % de survie dans les groupes témoins; concentration mesurée de la substance d'essai maintenue dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées pour chaque niveau de traitement	Concentration d'oxygène dissous ≥ 60 % de la VSA; température moyenne de 25 ± 2°C; 90 % de survie dans les groupes témoins; concentration mesurée de la substance d'essai maintenue dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées pour chaque niveau de traitement	Concentration d'oxygène dissous ≥ 60 % de la VSA; température moyenne de 26 ± 2°C; 90 % de survie dans les groupes témoins; concentration mesurée de la substance d'essai maintenue dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées pour chaque niveau de traitement

▼**M7**

Appendice 3

QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ACCEPTABLE

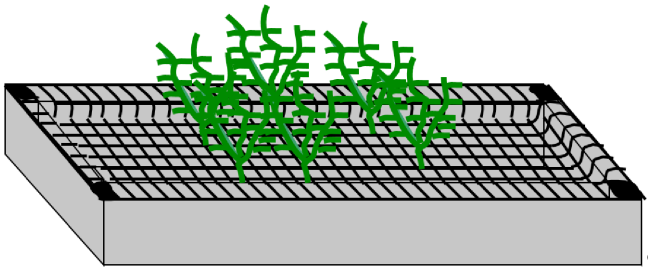
PARAMÈTRE	CONCENTRATION
Matières particulaires	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	< 50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

▼M7

Appendice 4A

SUBSTRAT DE FRAI POUR LES POISSONS-ZÈBRES

Plateau de frai: plat à instruments en verre, mesurant par exemple 22 × 15 × 5,5 cm (L × l × h), recouvert d'une grille amovible en acier inoxydable (mailles de 2 mm de largeur). La base de cette grille se trouve plus bas que le bord du plat.



Le substrat de frai est fixé sur la grille. Il forme une structure dans laquelle les poissons peuvent pénétrer. Des plantes d'aquarium artificielles en plastique vert, par exemple, peuvent convenir (NB: l'adsorption possible du produit chimique d'essai sur la matière plastique est prise en compte). Le plastique est lessivé dans un volume suffisant d'eau chaude et pendant un temps suffisant pour qu'aucun produit chimique ne risque de se retrouver dans la solution d'essai. Si des objets en verre sont utilisés, on veille à ce que les poissons ne soient ni blessés ni entravés lors de mouvements vigoureux.

La distance entre le plateau et les parois du récipient est d'au moins 3 cm pour que le frai ne se fasse pas à l'extérieur du plateau. Les œufs déposés sur le plateau traversent la grille et peuvent être prélevés 45 à 60 minutes après le début de l'éclairage. Les œufs translucides n'adhèrent pas et peuvent facilement être comptés grâce une lumière transversale. Pour cinq femelles par récipient, le nombre d'œufs pondus peut être considéré comme faible s'il est inférieur ou égal à 20 par jour, moyen s'il est compris entre 20 et 100, et élevé s'il est supérieur à 100. Le plateau de frai est retiré, les œufs ramassés et le plateau de frai réintroduit dans le récipient d'essai, le plus tard possible dans la soirée ou bien très tôt le matin. La réintroduction du plateau se fait dans un délai maximum d'une heure car sinon le signal du substrat de frai peut induire un accouplement et un frai à un moment inhabituel. Si la situation nécessite une introduction ultérieure du plateau de frai, il convient d'attendre au moins neuf heures après le début de l'éclairage. À cette heure tardive de la journée, l'induction de frai ne se fait plus.

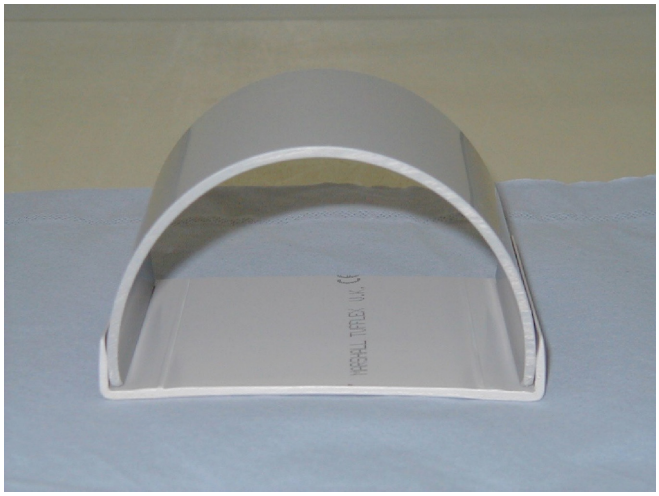
▼M7

Appendice 4B

SUBSTRAT DE FRAI POUR LES TÊTES-DE-BOULE

Deux ou trois plaques et plateaux de frai en plastique/céramique/verre ou en acier inoxydable combinés sont placés dans chaque enceinte d'essai (morceau de gouttière semi-circulaire grise de 80 mm de longueur posé sur un plateau à rebords de 130 mm de long, par exemple) (voir photo). Il est avéré que les plaques en PVC ou en céramique vieillies pouvaient convenablement servir de substrat de frai (Thorpe *et al*, 2007).

Il est recommandé d'utiliser des plaques abrasées pour améliorer l'adhérence. Le plateau est aussi muni d'un écran de protection empêchant les poissons d'accéder aux œufs tombés, à moins que l'efficacité de l'adhérence des œufs ait été démontrée pour le substrat de frai utilisé.



Le socle est conçu pour contenir tous les œufs qui n'adhèrent pas à la surface des plaques et tomberaient donc au fond de l'enceinte (ou les œufs déposés directement sur le socle en plastique plat). Tous les substrats de frai sont lessivés pendant au moins 12 heures dans l'eau de dilution avant leur utilisation.

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas. Aquatic Toxicology*, 81, 90–98.

▼M7

Appendice 5A

ÉVALUATION DES CARACTÈRES SEXUELS SECONDAIRES DU TÊTE-DE-BOULE POUR LA DÉTECTION DE CERTAINS PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

Synthèse

Chez les têtes-de-boule adultes, les caractéristiques physiques pouvant avoir de l'importance dans les essais de perturbateurs endocriniens sont les suivantes: couleur (claire/sombre), motifs de coloration (présence ou absence de bandes verticales), forme du corps (région de la tête et région pectorale, distension de l'abdomen) et caractères sexuels secondaires spécifiques de l'espèce (nombre et taille des tubercules nuptiaux, taille du bourrelet dorsal et ovipositeur).

Les tubercules nuptiaux sont situés sur la tête (bourrelet dorsal) des têtes-de-boule adultes mâles reproducteurs, et sont généralement disposés bilatéralement et symétriquement (Jensen *et al*. 2001). Les femelles et les juvéniles mâles et femelles des témoins ne développent pas de tubercule (Jensen *et al*. 2001). Il est possible de dénombrer jusqu'à huit tubercules individuels autour des yeux et entre les narines des mâles. Les tubercules les plus importants en nombre et en taille forment deux lignes parallèles situées juste en dessous des narines et au-dessus de la bouche. De nombreux poissons possèdent des groupes de tubercules sous la mâchoire inférieure; tout près de la bouche on en trouve généralement une seule paire alors que le ventre peut comprendre jusqu'à quatre tubercules. Le nombre de tubercules dépasse rarement 30 (fourchette, 18-28; Jensen *et al.* 2001). Les tubercules les plus nombreux forment une seule et même structure de forme plutôt arrondie, dont la hauteur est à peu près égale au rayon. Chez la plupart des mâles reproducteurs, certains tubercules sont si étendus et protubérants qu'il est impossible de les distinguer les uns des autres.

Certains types de perturbateurs endocriniens peuvent provoquer l'apparition anormale de caractères sexuels secondaires chez le sexe opposé; ainsi, les agonistes des récepteurs d'androgènes tels que la 17α-méthyltestostérone ou le 17β-trenbolone peuvent provoquer l'apparition de tubercules nuptiaux chez le tête-de-boule femelle (Smith, 1974; Ankley *et al.,* 2001, 2003), tandis que les agonistes des récepteurs d'œstrogènes peuvent réduire le nombre ou la taille des tubercules nuptiaux chez les mâles (Miles-Richardson *et al*., 1999; Harries *et al.*, 2000).

On trouvera ci-après une description de la caractérisation des tubercules nuptiaux chez les têtes-de-boule, fondée sur le mode opératoire utilisé par le laboratoire de l'Agence pour la protection de l'environnement des États-Unis (USEPA) à Duluth, Minnesota. Les produits et/ou équipements spécifiques peuvent être remplacés par des matériaux comparables disponibles.

L'utilisation d'une loupe à éclairage ou d'un microscope binoculaire de dissection à éclairage (3X) permet une observation optimale. On observera le poisson en position dorsale, partie antérieure vers l'avant (tête vers l'observateur).

— Placer le poisson dans une petite boîte de Pétri (100 mm de diamètre, par exemple), sur le dos, partie antérieure vers l'avant. Régler le viseur pour pouvoir identifier les tubercules. Faire rouler doucement le poisson d'un côté puis de l'autre pour identifier les zones où se trouvent les tubercules. Compter et classer les tubercules.

— Renouveler l'observation sur la partie ventrale antérieure après avoir placé le poisson sur le dos, partie antérieure vers l'avant, dans la boîte de Pétri.

— Les observations ne doivent pas prendre plus de 2 minutes par poisson.

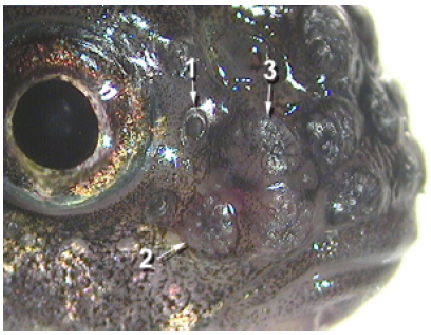
▼M7

Dénombrement et classement des tubercules

Six zones spécifiques ont été identifiées pour l'évaluation de la présence et du développement de tubercules chez les têtes-de-boule adultes. Une matrice a été créée pour cartographier la localisation des tubercules et la quantité de tubercules présents (voir la fin du présent appendice). Le nombre de tubercules est consigné, et les tubercules peuvent être classés comme suit en fonction de leur taille: 0-absence, 1-présent, 2-agrandi et 3-protubérant pour chaque organisme (photo 1).

Classe 0-absence de tout tubercule. Classe 1-tubercule présent, identifié comme tout tubercule dont un seul point est de hauteur presque égale à son rayon. Classe 2-tubercule agrandi, identifié par des tissus ressemblant à un astérisque, présentant généralement une large base radiale marquée de stries et de sillons partant du centre. La hauteur des tubercules est souvent plus irrégulière mais peut parfois être un peu arrondie. Classe 3-tubercule protubérant, de forme généralement plutôt large et arrondie et de structure moins bien définie. Ces tubercules s'agglomèrent parfois pour former une seule et même masse le long d'une zone ou de plusieurs zones (B, C et D, voir description ci-dessous). Leur couleur et leur forme sont similaires à celles de la classe 2, mais sont parfois assez indéterminées. Ce système de classement permet généralement d'obtenir un résultat global < 50 chez un mâle témoin normal possédant un nombre de tubercules compris entre 18 et 20 (Jensen *et al*. 2001).

Photo 1



Certains poissons peuvent présenter plus de tubercules que la matrice ne compte de cases pour une zone particulière. Dans ce cas, des chiffres supplémentaires peuvent être indiqués à l'intérieur, à droite ou à gauche de la case. La matrice n'a donc pas besoin d'afficher une symétrie. Une autre technique permettant de cartographier les tubercules allant par paires ou réunis verticalement le long du plan horizontal de la bouche pourrait consister à indiquer deux chiffres dans une seule case.

Zones cartographiées:

A — Tubercules situés autour des yeux. Localisés de dorsal à ventral autour du bord antérieur des yeux. Couramment multiples chez les mâles témoins mûrs, absents chez les femelles témoins, généralement par paires (un près de chaque œil) ou uniques chez les femelles exposées à des androgènes.

B-Tubercules situés entre les narines (pores-canaux sensoriels). Normalement par paires chez les mâles témoins à des niveaux de développement supérieurs (2-agrandi ou 3-protubérants). Absents chez les femelles témoins mais parfois présents chez les femelles exposées à des androgènes.

C — Tubercules situés immédiatement devant les narines, parallèlement à la bouche. Généralement agrandis ou protubérants chez les mâles témoins mûrs. Présents ou agrandis chez les mâles moins développés ou chez les femelles exposées à des androgènes.

▼M7

D — Tubercules situés parallèlement à la bouche. Généralement classés «développés» chez les mâles témoins. Absents chez les femelles témoins mais présents chez les femelles exposées à des androgènes.

E — Tubercules situés sur la mâchoire inférieure, près de la bouche, généralement petits et par paires. Variables chez les mâles témoins ou traités et chez les femelles traitées.

F — Tubercules situés sous la zone E. Généralement petits et par paires. Présents chez les mâles témoins et chez les femelles exposées à des androgènes.

RÉFÉRENCES

(1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.

(2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.

(3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows *(Pimephales promelas). Environ Sci Technol* 34:3003-3011.

(4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow *(Pimephales promelas). Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.

(5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.

(6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows *(Pimephales promelas). Aquat Toxicol* 47:129-145.

(7) Smith RJF. 1974. Effects of 17α-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows *(Pimephales promelas). Can J Zool* 52:1031-1038.

Matrice pour la cartographie des tubercules:

N° ident. ____

Date _____

Score total _____

Classification numérique

1-présent

2-agrandi

3-protubérant

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

		E	**X1**	**X1**	
	F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

▼M7

Appendice 5B

ÉVALUATION DES CARACTÈRES SEXUELS SECONDAIRES DU MEDAKA POUR LA DÉTECTION DE CERTAINS PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

La mesure des tubercules papillaires [1], qui sont les caractères sexuels secondaires du medaka (*Oryzias latipes*) est décrite ci-après.

(1) Après excision du foie (appendice 6), la carcasse est placée dans un tube conique contenant 10 ml environ de formol tamponné à 10 % (tête en haut, queue en bas). Si la gonade est fixée dans une autre solution que du formol tamponné à 10 %, pratiquer à l'aide d'un rasoir une incision transversale dans la carcasse entre la région antérieure de la nageoire anale et l'anus, en prenant soin de ne pas abîmer le gonopore et la gonade (fig.3). Placer la partie tête du corps du poisson dans la solution de fixation pour préserver la gonade, et la partie queue dans du formol tamponné à 10 % tel que décrit ci-dessus.

(2) Après avoir placé le poisson dans du formol tamponné à 10 %, saisir la région antérieure de la nageoire anale avec des pincettes et la plier pendant une trentaine de secondes pour que la nageoire anale reste ouverte. En prenant la nageoire anale avec les pincettes, saisir quelques rayons de nageoire dans la région antérieure en prenant soin de ne pas abîmer les tubercules papillaires.

(3) Après avoir maintenu la nageoire anale ouverte pendant une trentaine de secondes, placer le poisson dans du formol tamponné à 10 % à température ambiante jusqu'à la mesure des tubercules papillaires (cette mesure est effectuée au bout de 24 heures minimum).

Mesure

(1) Après avoir fixé le poisson dans le formol tamponné à 10 % pendant au moins 24 heures, retirer la carcasse du tube conique et essuyer le formol avec du papier filtre (ou essuie-tout).

(2) Placer le poisson abdomen vers le haut. Découper ensuite soigneusement la nageoire anale avec de petits ciseaux à dissection (il est préférable de découper la nageoire anale avec un peu de rayon endosquelettique).

(3) Saisir la région antérieure de la nageoire anale excisée avec des pincettes et la poser sur une lame de verre avec quelques gouttes d'eau. Couvrir ensuite la nageoire anale avec une lamelle couvre-objet. Prendre soin de ne pas abîmer les tubercules papillaires en prenant la nageoire anale avec les pincettes.

(4) Noter le nombre de plaques conjointes présentant des tubercules papillaires à l'aide du compteur placé sous un microscope biologique (microscope droit ou microscope inversé). On reconnaît les tubercules papillaires à la petite formation de tubercules visible sur le côté postérieur des plaques conjointes. Inscrire sur la feuille de travail le nombre de plaques conjointes présentant des tubercules papillaires pour chaque rayon de nageoire (premier rayon: 0,

[1] Les tubercules papillaires sont normalement présents uniquement chez les mâles adultes, et se situent entre le deuxième et le septième ou le huitième rayon de nageoire en comptant à partir de l'extrémité postérieure de la nageoire anale (fig.1 et 2). Ils apparaissent rarement sur le premier rayon en comptant à partir de l'extrémité postérieure de la nageoire anale. Cette procédure opératoire standard (POS) permet de mesurer les tubercules présents sur le premier rayon de nageoire (le numéro du rayon est déterminé en comptant à partir de l'extrémité postérieure de la nageoire anale dans cette POS).

▼M7

deuxième rayon: 10, troisième rayon: 12, etc.) puis inscrire leur somme sur la feuille Excel pour chaque poisson. Si nécessaire, photographier la nageoire anale et noter le nombre de plaques conjointes présentant des tubercules papillaires sur la photo.

(5) Après la mesure, placer la nageoire anale dans le tube conique décrit en (1) et le stocker.

Fig.1.

Schéma illustrant la différence de forme et de taille de la nageoire anale entre les sexes. A, mâle; B, femelle. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. *J. Fac. Sci.*, Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

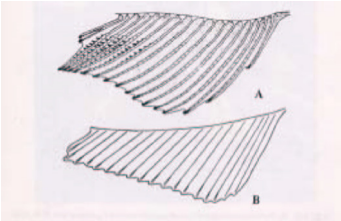


Fig.2.

A, Tubercules papillaires situés sur les plaques conjointes de la nageoire anale. J.P: plaque conjointe; A.S.: espace axial;P: tubercule. B, Extrémité distale de la nageoire anale. Les actinotriches (Act.) sont situés à l'extrémité. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. *J. Fac. Sci.*, Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

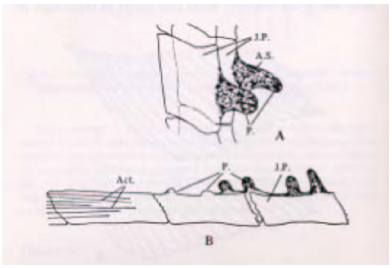
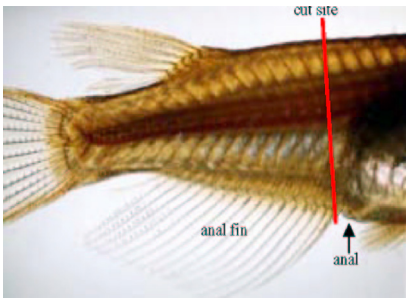


Fig.3.

Photographie montrant le site de coupe lorsque la gonade est fixée dans une autre solution que du formol tamponné à 10 %. Dans ce cas, le corps restant sera coupé entre la région antérieure de la nageoire anale et l'anus à l'aide d'un rasoir (trait rouge). La tête sera placée dans la solution de fixation pour préserver la gonade, et la queue dans le formol tamponné à 10 %.



▼M7

Appendice 6

PROCÉDURES RECOMMANDÉES POUR LES PRÉLÈVEMENTS EFFECTUÉS À DES FINS DE DOSAGE DE LA VITELLOGÉNINE

On prendra soin d'éviter la contamination croisée entre les échantillons de VTG des mâles et des femelles.

Procédure 1A: tête-de-boule, prélèvement sanguin dans l'artère / la veine caudale

Après anesthésie, le pédoncule caudal est partiellement sectionné avec une lame de scalpel, et un prélèvement sanguin est effectué dans l'artère / la veine caudale grâce à un tubule capillaire à microhématocrite héparinisé. Après le prélèvement sanguin, le plasma est rapidement séparé par centrifugation à température ambiante pendant 3 minutes à 15 000 g (ou bien à une température de 4°C pendant 10 minutes à 15 000 *g*). Le pourcentage d'hématocrite peut éventuellement être déterminé à l'issue de la centrifugation. Le plasma est ensuite retiré du tube à microhématocrite puis stocké dans un tube de centrifugeuse avec 0.13 unité d'aprotinine (un inhibiteur de protéase) à – 80°C jusqu'au dosage de la VTG. Selon la taille du tête-de-boule (qui dépend du sexe), les volumes de plasma pouvant être prélevés sont généralement de 5 à 60 µl par individu (Jensen *et al.* 2001).

Procédure 1B: tête-de-boule, prélèvement sanguin par ponction cardiaque

Il est également possible d'effectuer un prélèvement sanguin par ponction cardiaque effectuée à l'aide d'une seringue héparinisée (1 000 unités d'héparine par ml). Le sang est versé dans des tubes Eppendorf (maintenus dans de la glace) avant d'être centrifugé (5 minutes à 7 000 *g* à température ambiante). Le plasma est versé dans des tubes Eppendorf propres (dans des aliquotes si le volume de plasma le permet) puis rapidement congelé à – 80°C jusqu'à l'analyse (Panter *et al*., 1998).

Procedure 2A: Medaka japonais, excision du foie

Retrait des poissons d'essai de l'enceinte d'essai

(1) Les poissons d'essai sont sortis de l'enceinte d'essai à l'aide d'une épuisette. Attention à ne pas laisser tomber les poissons dans une autre enceinte d'essai.

(2) En principe, les poissons d'essai sont retirés dans l'ordre suivant: témoin, témoin solvant (s'il y a lieu), concentration minimale, concentration moyenne, concentration maximale et témoin positif. De plus, tous les mâles sont retirés de l'enceinte d'essai avant les femelles.

(3) Le sexe de chaque poisson d'essai est identifié à partir des caractères sexuels secondaires externes (forme de la nageoire anale, par exemple).

(4) Placer les poissons dans un conteneur puis les transporter jusqu'au poste de travail pour l'excision du foie. Vérifier les étiquettes de l'enceinte d'essai et du conteneur de transport par souci de précision et pour confirmer que le nombre de poissons sortis de l'enceinte d'essai et le nombre de poissons restés dans l'enceinte d'essai sont compatibles avec les prévisions.

(5) Si le sexe ne peut pas être identifié d'après l'apparence externe du poisson, sortir tous les poissons de l'enceinte d'essai. Dans ce cas, le sexe est identifié par observation de la gonade ou des caractères sexuels secondaires au stéréomicroscope.

Excision du foie

(1) Transférer les poissons d'essai du conteneur de transport vers la solution anesthésique avec l'épuisette.

▼M7

(2) après anesthésie, saisir les poissons d'essai avec des pinces (de modèle courant) pour les déposer sur le papier filtre (ou essuie-tout). En saisissant les poissons, appliquer les pinces sur les côtés de la tête pour éviter de casser la queue.

(3) Essuyer l'eau de la surface des poissons d'essai avec le papier filtre (ou essuie-tout).

(4) Placer les poissons sur le dos. Pratiquer ensuite une petite incision transversale entre la région ventre-nuque et le milieu de l'abdomen avec des ciseaux à dissection.

(5) Introduire les ciseaux à dissection dans la petite incision, et inciser l'abdomen le long de sa ligne médiane, depuis un point caudal par rapport au manteau branchial jusqu'au côté cranien de l'anus. Attention à ne pas introduire les ciseaux à disséquer trop profondément pour ne pas abîmer le foie et la gonade.

(6) Mener les opérations suivantes sous le stéréomicroscope.

(7) Placer les poissons sur le dos sur l'essuie-tout (ou une boîte de Pétri en verre ou une lame de verre).

(8) Écarter les parois de la cavité abdominale avec les pinces de précision puis extérioriser les organes internes. Il est également possible d'extérioriser les organes internes en retirant l'une des parois de la cavité abdominale si nécessaire.

(9) Étaler la partie qui relie le foie et la vésicule biliaire à l'aide d'une autre paire de pinces de précision. Saisir ensuite le canal biliaire et couper la vésicule biliaire. Veiller à ne pas rompre la vésicule biliaire.

(10) Saisir l'œsophage et exciser les intestins du foie selon la même méthode. Veiller à ce que le contenu du tube digestif ne s'échappe pas. Exciser l'intestin caudal de l'anus et retirer le tractus de la cavité abdominale.

(11) Retirer la masse de tissus graisseux et autres situés à la périphérie du foie. Prendre soin de ne pas abîmer le foie.

(12) Saisir la zone de la porte hépatique avec les pinces de précision et retirer le foie de la cavité abdominale.

(13) Placer le foie sur la lame de verre. A l'aide des pincettes de précision, retirer les autres tissus graisseux et étrangers (paroi abdominale interne, par exemple), s'il y a lieu, de la surface du foie.

(14) Peser le foie au moyen d'une balance de précision électronique, en utilisant comme tare un microtube de 1,5 ml. Consigner la valeur sur la feuille de travail (précision à 0,1 mg près). Confirmer les informations d'identification sur l'étiquette du microtube.

(15) Fermer le capuchon du microtube contenant le foie. Stocker le microtube dans un bac de refroidissement (ou un bac de glace).

(16) Après chaque excision de foie, nettoyer les instruments de dissection ou les remplacer par des instruments propres.

▼M7

(17) Retirer le foie de tous les poissons se trouvant dans les conteneurs de transport comme indiqué ci-dessus.

(18) Après excision du foie de tous les poissons se trouvant dans le conteneur de transport (c'est-à-dire de tous les mâles et de toutes les femelles d'une enceinte d'essai), placer tous les spécimens hépatiques sur un support pour tubes muni d'une étiquette d'identification puis les stocker dans un congélateur. Lorsque les foies sont fournis pour pré-traitement peu de temps après leur excision, les spécimens sont transportés jusqu'au poste de travail le plus proche dans un bac de refroidissement (ou un bac de glace).

Après excision du foie, la carcasse est prête pour l'histologie gonadique et la mesure des caractères sexuels secondaires.

Spécimens

Stocker les spécimens hépatiques prélevés sur les poissons d'essai à une température ≤ – 70°C s'ils ne sont pas utilisés pour le pré-traitement juste après leur excision.

Fig-1

Une incision est pratiquée avec des ciseaux juste avant les nageoires pectorales.

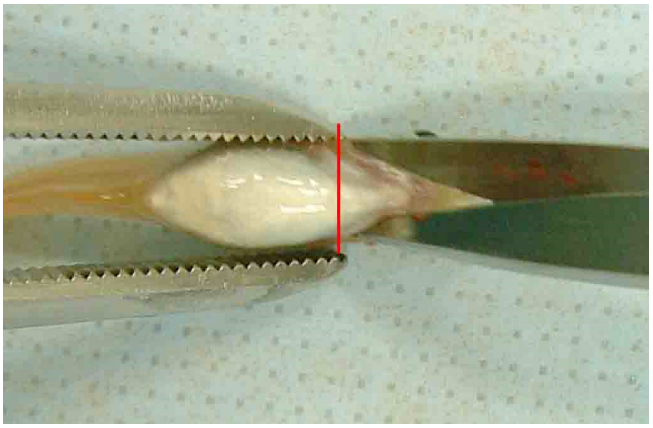
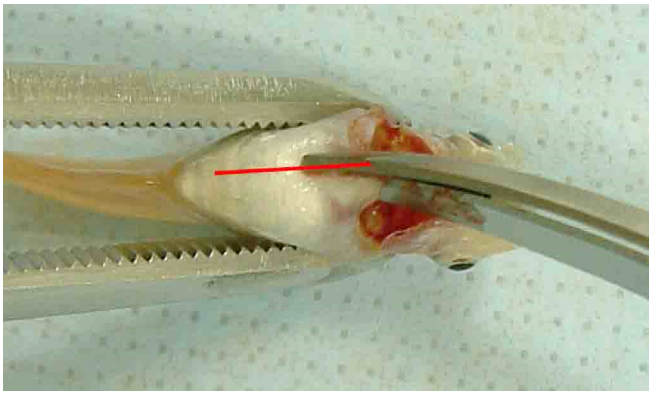


Fig-2

La ligne médiane de l'abdomen est incisée avec des ciseaux jusqu'à un point situé environ 2 mm au-dessus de l'anus.



▼M7

Fig-3

Les parois abdominales sont écartées avec des pinces pour exposer le foie et les autres organes internes

(elles peuvent aussi être épinglées latéralement).

La flèche montre le foie.

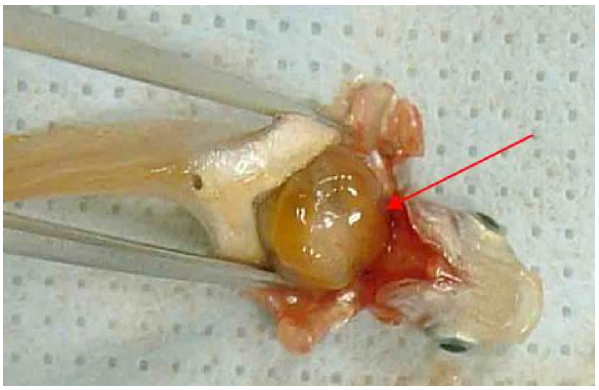


Fig-4

Le foie est disséqué et excisé avec des pinces.

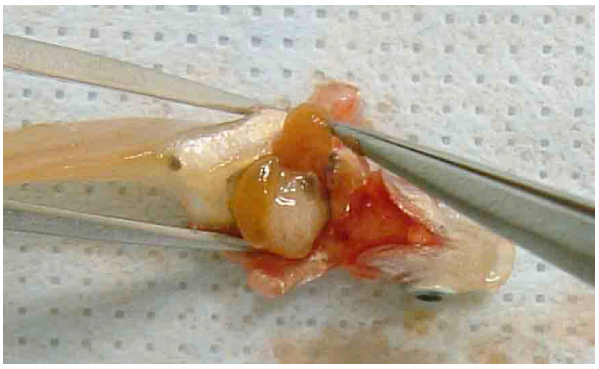
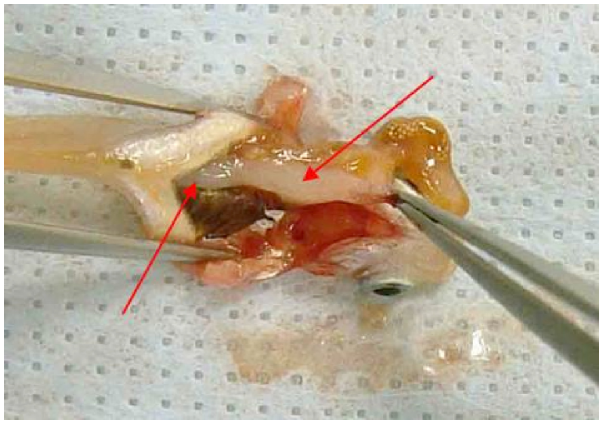


Fig-5

Les intestins sont délicatement retirés avec des pinces.



▼M7

Fig-6

Les deux extrémités des intestins et les attaches du mésentère sont sectionnées avec des ciseaux.

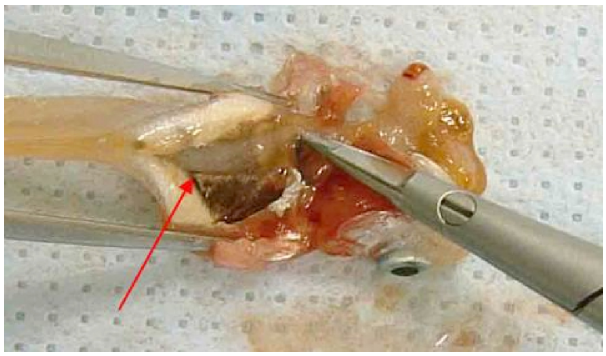


Fig-7 (femelle)

La procédure est identique pour les femelles.

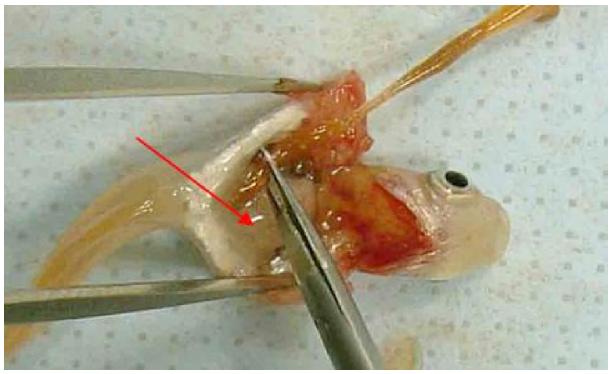
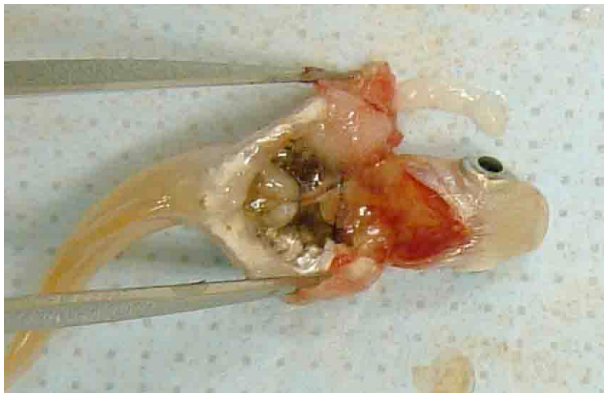


Fig-8

Procédure achevée.



▼M7

Procédure 2 B: Medaka japonais (*Oryzias latipes*), pré-traitement du foie pour le dosage de la vitellogénine

Retirer la bouteille contenant le tampon d'homogénat du kit ELISA et la refroidir avec de la glace pilée (température de la solution: ≤ 4 °C). Si un tampon d'homogénat provenant d'un kit ELISA EnBio est utilisé, laisser décongeler la solution à température ambiante, puis conserver la bouteille au frais avec de la glace pilée.

Calculer le volume de tampon d'homogénat pour le foie à partir du poids de ce dernier (utiliser 50 µl de tampon d'homogénat par mg de foie). Exemple: Si le foie pèse 4,5 mg, le volume de tampon d'homogénat pour le foie sera de 225 µl. Dresser une liste des volumes de tampon d'homogénat pour tous les foies.

Préparation du foie pour le pré-traitement

(1) Retirer le microtube de 1,5 ml contenant le foie du congélateur juste avant le pré-traitement.

(2) Le pré-traitement du foie des mâles est effectué avant celui des femelles pour éviter toute contamination de la vitellogénine. De plus, le pré-traitement des groupes d'essai est effectué dans l'ordre suivant: témoin, témoin solvant (s'il y a lieu), concentration minimale, concentration moyenne, concentration maximale et témoin positif.

(3) Le nombre de microtubes de 1,5 ml contenant les échantillons hépatiques sortis du congélateur à un moment donné ne dépasse pas le nombre de tubes pouvant être centrifugés à ce moment-là.

(4) Placer les microtubes de 1,5 ml contenant les échantillons hépatiques dans le bac de glace selon l'ordre de numérotation des spécimens (la décongélation du foie n'est pas utile).

Déroulement du pré-traitement

1) Ajout du tampon d'homogénat

Vérifier sur la liste le volume de tampon d'homogénat à utiliser pour un échantillon hépatique particulier et ajuster la micropipette (gamme de volumes: 100-1 000 µl) au volume approprié. Attacher un embout propre à la micropipette.

Retirer le tampon d'homogénat du flacon de réactif et ajouter le tampon dans le microtube de 1,5 ml contenant le foie.

Ajouter le tampon dans tous les microtubes de 1,5 ml contenant les échantillons hépatiques selon la procédure décrite ci-dessus. Il n'est pas nécessaire de remplacer l'embout de la micropipette par un embout neuf. Toutefois, si l'embout est contaminé ou suspect de contamination, il est changé.

2) Homogénéisation du foie

— Attacher un nouveau pilon d'homogénéisation à l'homogénéisateur du microtube.

— Introduire le pilon dans le microtube de 1,5 ml. Maintenir l'homogénéisateur pour presser le foie entre la surface du pilon et la paroi interne du microtube.

— Faire fonctionner l'homogénéisateur pendant 10 à 20 secondes. Conserver le microtube au frais avec de la glace pilée pendant l'opération.

▼M7

— Retirer le pilon du microtube et laisser reposer pendant une dizaine de secondes. Procéder ensuite à une inspection visuelle de l'état de la suspension.

— Si des morceaux de foie sont observés dans la suspension, répéter les opérations (3) et (4) pour obtenir un homogénat de foie satisfaisant.

— Conserver l'homogénat hépatique en suspension dans le bac de glace jusqu'à sa centrifugation.

— Utiliser un pilon neuf pour chaque homogénat.

— Homogénéiser tous les foies avec un tampon d'homogénat selon la procédure décrite ci-dessus.

3) Centrifugation de l'homogénat hépatique en suspension

— Confirmer que la température de la centrifugeuse réfrigérée est ≤ 5 °C.

— Introduire les microtubes de 1,5 ml contenant l'homogénat hépatique en suspension dans la centrifugeuse réfrigérée (rééquilibrer s'il y a lieu).

— Centrifuger l'homogénat hépatique en suspension pendant 10 minutes à 13 000 g à une température ≤ 5 °C. Toutefois, si les surnageants sont correctement séparés, la force centrifuge et la durée de centrifugation peuvent être ajustées s'il y a lieu.

— Après la centrifugation, vérifier que les surnageants sont correctement séparés (surface: lipides, intermédiaire: surnageant, culot: tissu hépatique). Si la séparation n'est pas concluante, renouveler la centrifugation de la suspension dans les mêmes conditions.

— Retirer tous les échantillons de la centrifugeuse réfrigérée et les placer dans le bac de glace selon l'ordre de numérotation des spécimens. Prendre soin de ne pas remettre en suspension les couches séparées après centrifugation.

4) Collecte du surnageant

— Placer quatre microtubes de 0,5 ml destinés au stockage du surnageant sur le support pour tubes.

— Recueillir 30 µl de chaque surnageant (formant la couche intermédiaire après séparation) à l'aide de la micropipette et les verser dans un microtube de 0,5 ml. Prendre soin de ne pas recueillir de lipides de la surface ou de tissu hépatique du culot.

— Recueillir le surnageant et le verser dans deux autres microtubes de 0,5 ml selon la procédure décrite ci-dessus.

— Recueillir le reste du surnageant à l'aide de la micropipette (si possible: ≥ 100 µl). Verser ensuite le surnageant dans le microtube de 0,5 ml restant. Prendre soin de ne pas recueillir de lipides de la surface ou de tissu hépatique du culot.

— Fermer le microtube de 0,5 ml avec le capuchon et inscrire le volume de surnageant sur l'étiquette. Placer immédiatement les microtubes dans le bac de glace.

— Remplacer l'embout de la micropipette par un embout neuf pour chaque surnageant. Si une grande quantité de lipides adhère à l'embout, remplacer immédiatement ce dernier par un embout neuf pour éviter la contamination de l'extrait hépatique avec la graisse.

▼M7

— Verser tout le surnageant centrifugé dans quatre microtubes de 0,5 ml selon la procédure décrite ci-dessus.

— Après avoir versé le surnageant dans les microtubes de 0,5 ml, placer tous ces derniers sur le support pour tubes avec leur étiquette d'identification, puis les mettre immédiatement au congélateur. Si les concentrations de VTG sont mesurées immédiatement après le pré-traitement, conserver au frais un microtube de 0,5 ml (contenant 30 µl de surnageant) dans le support pour tubes et le transférer jusqu'au poste de travail où l'essai ELISA est conduit. Dans ce cas, placer les microtubes restants dans les supports pour tubes et mettre le tout au congélateur.

— Après la collecte du surnageant, jeter le résidu de manière appropriée.

Stockage des spécimens

Stocker les microtubes de 0,5 ml contenant le surnageant de l'homogénat hépatique à une température ≤ – 70 °C jusqu'à la conduite de l'essai ELISA.

Procédure 3A: Poisson-zèbre, prélèvement sanguin dans l'artère / la veine caudale

Immédiatement après anesthésie, le pédoncule caudal est sectionné transversalement, et un prélèvement sanguin est effectué dans l'artère / la veine caudale grâce à un tubule capillaire à microhématocrite héparinisé. Les volumes sanguins collectés varient entre 5 et 15 µl selon la taille du poisson. Un volume identique de tampon d'aprotinine [6 microgrammes/ml de solution tampon phosphate (PBS)] est ajouté dans le tube microcapillaire, et le plasma est séparé du sang par centrifugation (5 minutes à 600 g). Le plasma est versé dans des tubes à essais puis stocké à une température de – 20 °C jusqu'au dosage de la VTG ou d'autres protéines produisant des effets intéressants.

Procédure 3B: Poisson-zèbre, prélèvement sanguin par ponction cardiaque

Pour éviter la coagulation du sang et la dégradation de la protéine, les échantillons sont collectés sur une solution tampon phosphate (PBS) contenant de l'héparine (1 000 unités/ml) et de l'aprotinine, un inhibiteur de protéase (2 TIU/ml). Pour constituer le tampon, il est recommandé d'utiliser de l'héparine, du sel d'ammonium et de l'aprotinine lyophilisée. Pour le prélèvement sanguin, une seringue (1 ml) munie d'une fine aiguille fixe (Braun Omnikan-F, par exemple) est recommandée. La seringue est pré-remplie avec le tampon (approximativement 100 microlitres) afin d'éluer complètement les faibles volumes sanguins de chaque poisson. Les prélèvements sanguins sont effectués par ponction cardiaque. Tout d'abord, le poisson est anesthésié avec du MS-222 (100 mg/l). Le bon plan d'anesthésie est celui qui permet à l'utilisateur de distinguer le battement du cœur du poisson-zèbre. Pendant la ponction cardiaque, maintenir le piston de la seringue sous faible tension. Les volumes sanguins pouvant être collectés varient entre 20 et 40 microlitres. Après la ponction cardiaque, le mélange sang/tampon est placé dans le tube à essais. Le plasma est séparé du sang par centrifugation (20 minutes à 5 000 g) et est stocké à une température de – 80°C jusqu'à l'analyse.

Procédure 3C: MON: Poisson-zèbre, homogénéisation de la tête et de la queue

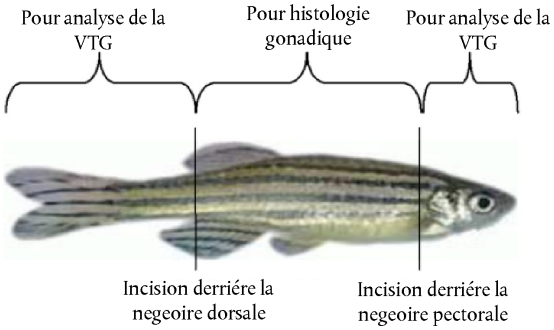
1. Les poissons sont anesthésiés puis euthanasiés conformément à la description de l'essai.

2. La tête et la queue du poisson sont coupées comme indiqué sur la figure 1.

Note importante: *Tous les instruments de dissection ainsi que la planche à découper sont rincés et lavés correctement (avec de l'éthanol à 96 %, par exemple) entre chaque manipulation de poisson pour éviter que la vitellogénine des femelles ou des mâles induits ne «pollue» les mâles non-induits.*

▼**M7**

Figure 1



3. L'ensemble tête-queue de chaque poisson est pesé au mg prêt.

4. Après avoir été pesés, les morceaux sont placés dans des tubes appropriés (Eppendorf de 1.5 ml, par exemple) et stockés à une température de – 80 °C jusqu'à leur homogénéisation ou bien directement homogénéisées sur de la glace avec deux pilons en plastique. (D'autres méthodes peuvent être utilisées si elles impliquent de la glace et permettent d'obtenir une masse homogène). Note importante: *Les tubes sont numérotés correctement de façon que la tête et la queue du poisson puissent être reliées à la partie du corps correspondante utilisée pour l'histologie gonadique.*

5. Après obtention d'une masse homogène, on ajoute un **tampon d'homogénéisation** ([1]) glacé représentant 4 x la masse pondérale tissulaire. Continuer à pilonner jusqu'à ce que le mélange soit homogène. Note importante: *De nouveaux pilons sont utilisés pour chaque poisson.*

6. Les échantillons sont placés sur de la glace jusqu'à centrifugation à 50 000 g pendant 30 min. et à une température de **4 °C**.

7. Utiliser une pipette pour répartir des portions de 20 µl de surnageant dans **au moins deux** tubes en plongeant l'embout de la pipette sous la couche lipidique située à la surface et en aspirant doucement le surnageant sans fraction lipidique ni culot.

8. Les tubes sont stockés à une température de – 80 °C jusqu'à leur utilisation.

([1]) Tampon d'homogénéisaton:
— [50 mM de Tris-HCl de pH 7,4; 1 % de cocktail d'inhibiteurs de protéase (Sigma)]: 12 ml de Tris-HCl de pH 7,4 + 120 µl de cocktail d'inhibiteurs de protéase.
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) de chez Bie & Berntsen (Danemark), par exemple.
— Cocktail d'inhibiteurs de protéase: de chez Sigma (pour les tissus mammaliens). Numéro de produit P 8340.
NOTE: Le tampon d'homogénéisation est utilisé le jour de sa fabrication. Placer sur de la glace pendant son utilisation.

▼M7

Appendice 7

ÉCHANTILLONS SUPPLÉMENTÉS EN VITELLOGÉNINE ET ÉTALON DE RÉFÉRENCE INTER-ESSAIS

Chaque jour où des essais d'induction de la VTG sont effectués, un échantillon supplémenté préparé à l'aide d'un étalon de référence inter-essais sera analysé. La VTG utilisée pour préparer l'étalon de référence inter-essais sera issue d'un lot différent de celui utilisé pour préparer les solutions-étalons pour l'essai en cours.

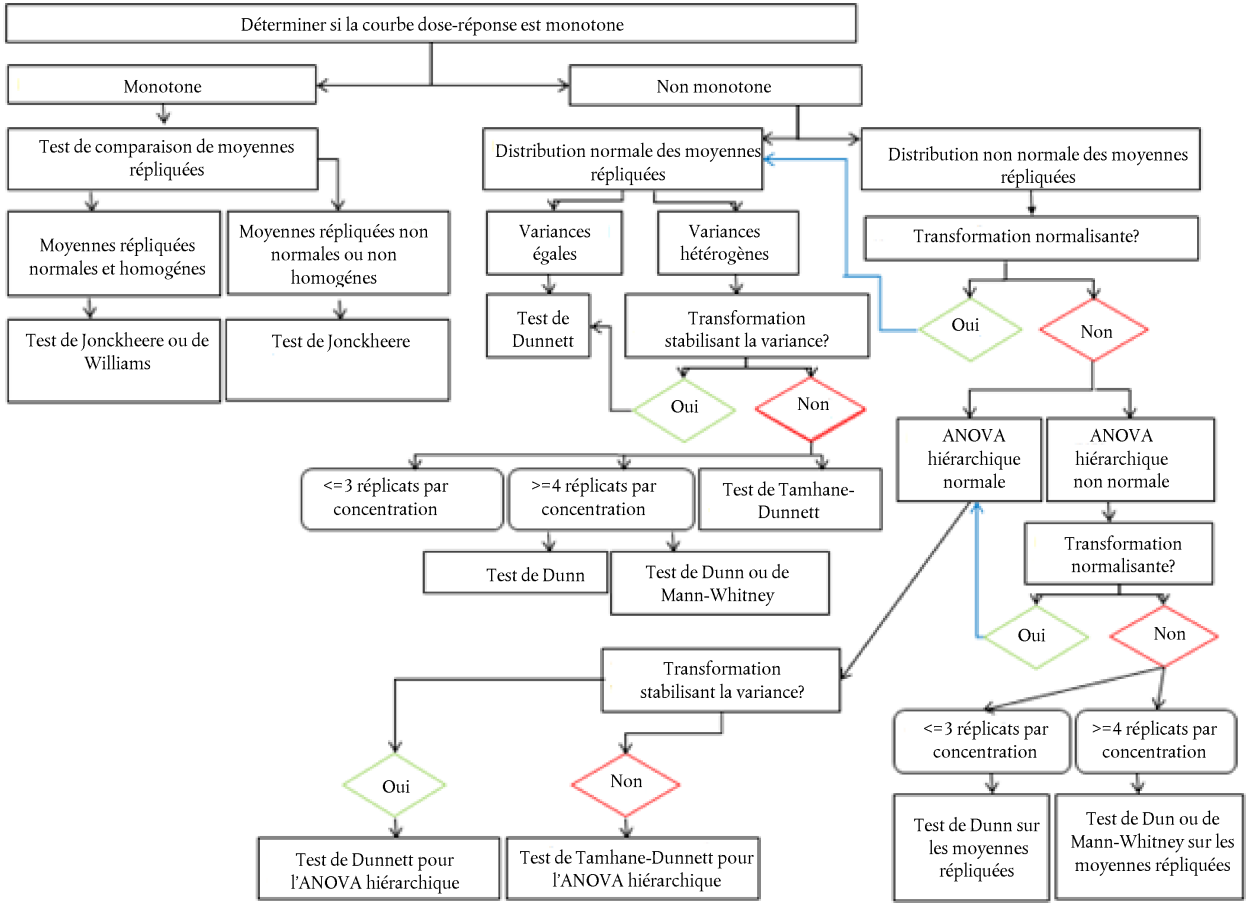
Pour préparer l'échantillon supplémenté, on ajoutera une quantité connue d'étalon inter-essais à un échantillon de plasma de mâle témoin. L'échantillon sera supplémenté jusqu'à atteindre une concentration de VTG de 10 à 100 fois supérieure à la concentration de vitellogénine attendue chez les mâles témoins. L'échantillon de plasma ainsi supplémenté peut provenir d'un seul poisson ou de plusieurs poissons.

Un sous-échantillon du plasma de mâle témoin non supplémenté sera analysé dans au moins deux puits dupliqués. L'échantillon supplémenté sera aussi analysé dans au moins deux puits dupliqués. La quantité moyenne de VTG dans les deux échantillons non supplémentés de plasma de mâle témoin sera ajoutée à la quantité calculée de VTG ajoutée pour fortifier les échantillons afin de déterminer la concentration attendue. Le rapport entre cette concentration attendue et la concentration mesurée sera noté avec les résultats de chaque série d'essais effectués le même jour.

▼M7

Appendice 8

ORDINOGRAMME D'ANALYSE STATISTIQUE



▼M7

C.49. POISSON, ESSAI DE TOXICITÉ AIGUË AU STADE EMBRYONNAIRE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 236 (2013) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Elle décrit un essai de toxicité aiguë chez le poisson-zèbre (*Danio rerio*) au stade embryonnaire. Cet essai vise à déterminer la toxicité aiguë des produits chimiques sur les poissons au stade embryonnaire. Il repose sur des études et des activités de validation menées sur le poisson-zèbre (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)-(12)(13)(14). Il a été appliqué avec succès à une large gamme de produits chimiques présentant différents modes d'action, solubilités, volatilités et hydrophobicités (voir les paragraphes 15 et 16).

2. Les définitions utilisées dans la présente méthode d'essai sont présentées à l'appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

3. Les œufs de poisson-zèbre fraîchement fécondés sont exposés au produit chimique d'essai durant une période de 96 heures. Toutes les 24 heures, jusqu'à quatre observations apicales utilisées comme indicateurs de létalité sont enregistrées (6): (i) la coagulation des œufs fécondés, (ii) l'absence de formation de somites, (iii) le non-détachement du bourgeon caudal dans le sac vitellin, (iv) l'absence de battements du cœur. À la fin de la période d'exposition, on détermine la toxicité aiguë d'après le résultat positif obtenu en ce qui concerne l'une des quatre observations apicales notées, et l'on calcule la CL_{50}.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

4. En ce qui concerne les propriétés du produit chimique d'essai, les informations suivantes sont utiles: formule structurale, poids moléculaire, pureté, stabilité dans l'eau et à la lumière, pK_a et $K_{o/e}$, hydrosolubilité, pression partielle de la forme gazeuse du composé ainsi que résultats d'un essai de biodégradabilité facile (méthode d'essai C.4 (17) ou C.29 (18). On peut utiliser la solubilité et la pression de vapeur pour calculer la constante de Henry, qui indique les risques de perte par évaporation du produit chimique d'essai. Pour déterminer la concentration du produit chimique d'essai dans les solutions d'essai, il convient d'appliquer une méthode d'analyse fiable, dont la précision et la limite de détection sont connues et mentionnées dans le rapport.

5. Si la méthode d'essai est utilisée pour tester un mélange, sa composition devrait être déterminée dans la mesure du possible, p.ex. par l'identité chimique de ses constituants, leur présence et quantité, ainsi que leurs propriétés spécifiques (telles que mentionnées au paragraphe précédent). Avant d'utiliser la méthode d'essai pour tester un mélange à des fins réglementaires, il convient de vérifier si les résultats seront acceptables dans le cadre réglementaire imposé.

6. En ce qui concerne les produits chimiques pouvant être activés via le métabolisme, des études montrent que les embryons de poisson-zèbre ont des capacités de biotransformation (18)(19)(20)(21). Cependant, la capacité métabolique des embryons de poissons n'est pas toujours du même ordre de grandeur que celle des poissons juvéniles ou adultes. Ainsi, les propriétés protoxiques de l'alcool allylique (9) n'ont pas été reconnues par le présent essai. Par conséquent, si certains éléments indiquent que les métabolites ou d'autres produits de transformation pertinents peuvent être plus toxiques que le composé initial, il est recommandé d'inclure également ces métabolites ou produits de transformation dans l'essai et d'utiliser également ces résultats au moment de conclure sur la toxicité du produit chimique d'essai, ou sinon de conduire un autre essai qui tient mieux compte du métabolisme.

7. On suppose que les embryons ne seront pas sensibles aux produits chimiques de poids moléculaire $\geq$ 3kDa, dont l'encombrement moléculaire est très important, ou aux produits chimiques qui retardent l'éclosion, ce qui risque d'empêcher ou de réduire l'exposition après l'éclosion, en raison de la biodisponibilité limitée de ces produits chimiques, pour lesquels d'autres essais de toxicité pourraient être plus adaptés.

▼**M7**

VALIDITÉ DE L'ESSAI

8. Pour établir la validité des résultats de l'essai, les critères suivants s'appliquent:

a) Le taux global de fécondation de l'ensemble des œufs collectés doit être supérieur ou égal à 70 % dans l'ensemble testé.

b) La température de l'eau doit être maintenue à 26 ± 1 °C dans les enceintes d'essai pendant toute la durée de l'essai.

c) Le taux global de survie des embryons dans le témoin négatif (contenant l'eau de dilution) et, le cas échéant, dans le témoin contenant le solvant doit être supérieur ou égal à 90 % jusqu'à la fin de la période d'exposition de 96 heures.

d) L'exposition au témoin positif (4,0 mg/l de 3,4-dichloroaniline pour le poisson-zèbre, par exemple) doit avoir pour résultat une mortalité de 30 % minimum à la fin de la période d'exposition de 96 heures.

e) Le taux d'éclosion dans le témoin négatif (et, le cas échéant, dans le témoin solvant) doit être supérieur ou égal à 80 % à la fin de la période d'exposition de 96 heures.

f) À la fin de la période d'exposition de 96 heures, la concentration d'oxygène dissous dans le témoin négatif et la concentration d'essai maximale doivent être supérieures ou égales à 80 % de la valeur de saturation.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

9. On trouvera à l'appendice 2 des indications sur les conditions d'entretien et d'expérimentation recommandées.

Appareillage

10. Le matériel suivant est nécessaire:

a) récipients en verre ou tout autre matériau chimiquement inerte, suffisamment grands par rapport à la charge recommandée (voir le paragraphe 14, «Entretien des poissons géniteurs»);

b) microscope inversé et/ou binoculaire d'une capacité de grossissement d'au moins 80×. Si la température de la pièce où sont notées les observations ne peut pas être réglée à 26 ± 1 °C, une platine chauffante à mouvements croisés ou d'autres méthodes permettant de maintenir la température sont nécessaires;

c) enceintes d'essai; par exemple, plaques standard à 24 puits d'une profondeur de 20 mm environ (voir le paragraphe 10, «Enceintes d'essai»);

d) film autocollant, par exemple, pour couvrir les plaques 24 puits;

e) incubateur ou pièce climatisée avec température contrôlée, permettant le maintien de la température à 26 ± 1 °C dans les puits (ou les enceintes);

f) pH-mètre;

g) oxymètre;

h) matériel de détermination de la dureté de l'eau et de la conductivité;

i) piège à frai: plats à instruments en verre, acier inoxydable ou tout autre matériau inerte; grille (mailles de 2 ± 0,5 mm) en acier inoxydable ou tout autre matériau inerte pour protéger les œufs pondus; substrat de frai (plantes artificielles en matériau inerte, par exemple) [méthode d'essai C.48, appendice 4A (23)];

j) pipettes à large ouverture pour la collecte des œufs;

▼M7

k) récipients en verre pour préparer différentes concentrations d'essai ainsi que l'eau de dilution (béchers, fioles graduées, éprouvettes graduées et pipettes graduées) ou pour collecter les œufs de poisson-zèbre (béchers, plats de cristallisation, etc.);

l) en cas de recours à un autre mode d'exposition tel qu'un système dynamique (24) ou passif (25) pour la conduite de l'essai, on utilisera les installations et matériels appropriés.

Enceintes d'essai

11. On utilisera des enceintes d'essai en verre ou en polystyrène (exemple: plaques à 24 puits d'une capacité de remplissage de 2,5 — 5 ml par puits). En cas de suspicion d'adsorption au polystyrène *(*substances planes non polaires, ayant un $K_{O/E}$ élevé, par exemple*)*, on utilisera des matériaux inertes tels que le verre pour réduire les pertes dues à l'adsorption (26). Les enceintes d'essai seront positionnées de façon randomisée dans l'incubateur.

Eau et conditions d'expérimentation

12. Il est recommandé de diluer l'eau d'élevage pour atteindre les niveaux de dureté typiques d'une grande variété d'eaux de surface. On utilisera de l'eau reconstituée pour préparer l'eau de dilution (27). Le degré de dureté obtenu doit être équivalent à 100-300 mg/l de $CaCO_3$ pour empêcher la précipitation excessive du carbonate de calcium. Il est possible d'utiliser une autre eau de surface ou eau de puits bien caractérisée. On peut adapter l'eau reconstituée pour obtenir une eau d'élevage de faible dureté en la diluant avec de l'eau désionisée selon un rapport de 1:5 maximum jusqu'à atteindre une dureté minimale de 30-35 mg/l de $CaCO_3$. L'eau est aérée jusqu'à saturation en oxygène avant l'ajout du produit chimique. Tout au long de l'essai, la température dans les puits doit être maintenue à 26 ± 1 °C. Le pH doit être compris entre 6,5 et 8,5, et ne doit pas varier de plus de 1,5 unité dans cette plage au cours de l'essai. Si on pense que le pH ne restera pas dans cette plage, alors il convient de procéder à un ajustement de pH avant d'initier l'essai. Le pH doit être ajusté de telle façon que la concentration de la solution-mère ne change pas de manière significative et qu'il n'y ait pas de réaction chimique ni de précipitation du produit chimique d'essai. Il est recommandé d'utiliser de l'acide chlorhydrique (HCl) et de l'hydroxyde de sodium (NaOH) pour corriger le pH des solutions contenant le produit chimique d'essai.

Solutions d'essai

13. Des solutions d'essai des concentrations sélectionnées peuvent être préparées, par exemple par dilution d'une solution-mère. Les solutions-mères doivent, de préférence, être préparées par simple mélange ou agitation du produit chimique d'essai dans l'eau de dilution par des moyens mécaniques (agitation ou ultrasons, par exemple). Si le produit chimique d'essai se dissout difficilement dans l'eau, on suivra les procédures décrites dans le document d'orientation n° 23 de l'OCDE sur les essais de substances et mélanges difficiles (28). On évitera d'utiliser des solvants; leur usage peut néanmoins se révéler nécessaire dans certains cas pour produire une solution-mère convenablement concentrée. Si un solvant est quand même utilisé pour aider à la préparation de la solution-mère, sa concentration finale ne devra pas dépasser 100 µl/l et devra être identique dans tous les récipients d'essai. En cas d'utilisation d'un solvant, un autre témoin contenant le solvant est nécessaire.

Entretien des poissons géniteurs

14. Un stock de poissons-zèbres reproducteurs sauvages et non exposés, dont le taux de fécondation des œufs est bien documenté, devra être utilisé pour la production des œufs. Les poissons ne doivent pas présenter de symptômes d'infection et de maladie discernables à l'examen macroscopique et ne doivent pas avoir reçu de traitement pharmaceutique (aigu ou prophylactique) au cours des deux mois précédant le frai. Les poissons géniteurs

▼M7

sont maintenus dans des aquariums ayant une capacité de charge recommandée de 1 l d'eau par poisson et une photopériode fixe de 12-16 heures (29)(30)(31)(32)(33). La vitesse de filtration doit être ajustée de façon optimale; des vitesses de filtration excessives provoquant de fortes perturbations de l'eau sont à éviter. En ce qui concerne les conditions d'alimentation, on consultera l'appendice 2. Il convient d'éviter une alimentation trop abondante, et la qualité de l'eau ainsi que la propreté des aquariums devront être contrôlées régulièrement et, si nécessaire, rétablies à l'état initial.

Épreuve de compétence

15. En tant que produit chimique de référence, le 3,4-dichloroaniline [utilisé dans les études de validation (1)(2)] doit être testé dans une gamme complète de concentrations-réponses pour vérifier la sensibilité de la souche de poissons utilisée, de préférence deux fois par an. Les laboratoires qui entreprennent cet essai pour la première fois devront utiliser la substance de référence. Un laboratoire peut utiliser cette substance pour démontrer sa compétence technique à réaliser l'essai avant de soumettre les données à des fins réglementaires.

Production des œufs

16. Les œufs de poisson-zèbre peuvent être produits *via* des groupes de frai (dans des cuves de frai individuelles) ou *via* un frai de masse (dans les cuves d'entretien). Dans le cas des groupes de frai, les mâles et les femelles (dans un rapport de 2:1, par exemple) d'un groupe reproducteur sont placés dans des cuves de frai pendant quelques heures avant la tombée du jour précédant l'essai. Sachant qu'il se peut que les groupes de frai de poissons-zèbres ne parviennent pas à frayer, il est recommandé d'utiliser en parallèle au moins trois cuves de frai. Pour éviter les biais génétiques, les œufs sont collectés à partir de trois groupes reproducteurs minimum, mélangés et sélectionnés au hasard.

17. Pour la collecte des œufs, des pièges à frai sont placés dans les cuves de frai ou dans les cuves d'entretien avant la tombée du jour précédant l'essai, ou avant les premières lueurs du jour de l'essai. Pour empêcher la prédation des œufs par les poissons-zèbres adultes, on couvre les pièges à frai avec une grille en matériau inerte composée de mailles de taille appropriée (approx. 2 ± 0,5 mm). Si cela est jugé nécessaire, des plantes artificielles en matériau inerte (plastique, verre, etc.) peuvent être fixées à la grille pour servir de stimulus de frai (3)(4)(5)(23)(35). On utilisera des matières plastiques patinées et qui ne libèrent pas de substances contaminantes, telles que les phtalates. L'accouplement, le frai et la fécondation ont lieu avant l'expiration d'un délai de 30 minutes à compter de l'apparition des premières lueurs du jour, et les pièges à frai avec les œufs collectés peuvent être retirés délicatement. Il est recommandé de rincer les œufs avec de l'eau reconstituée après le retrait des œufs des pièges à frai.

Différenciation des œufs

18. À 26°C, les œufs fécondés subissent la première segmentation au bout d'une quinzaine de minutes, et les segmentations synchrones consécutives forment 4, 8, 16 et 32 blastomères (voir appendice 3) (35). À ces stades, le développement d'une blastula permet d'identifier clairement les œufs fécondés.

PROCÉDURE

Conditions d'exposition

19. Vingt embryons par concentration (un embryon par puits) sont exposés au produit chimique d'essai. L'exposition au produit chimique d'essai devrait permettre de maintenir les concentrations d'essai autour de ± 20 % de la concentration nominale pendant la durée de l'essai. Si cela s'avère impossible au cours d'un essai statique, un système de renouvellement semi-statique devra être envisagé (p.ex. avec un renouvellement toutes les 24 heures). Dans ce cas, les concentrations d'exposition devront être vérifiées au minimum à la concentration la plus haute et la concentration la plus basse au début et à la fin de chaque intervalle de renouvellement de la solution (voir paragraphe 36). Si une concentration d'exposition autour de ± 20 % de la concentration nominale ne peut être maintenue, toutes les concentrations d'exposition doivent être mesurées au début et à la fin de chaque intervalle de renouvellement (voir paragraphe 36). Lors du renouvellement, on veillera

▼M7

à ce que les embryons soient toujours recouverts d'une petite quantité d'anciennes solutions d'essai pour éviter leur dessiccation. Il est possible d'adapter le protocole de l'essai pour respecter les exigences applicables aux essais de produits chimiques spécifiques [par exemple, systèmes de dosage dynamiques (24) ou passifs (25) pour les produits chimiques facilement dégradables ou hautement adsorbants (29), ou autres systèmes pour les produits chimiques volatiles (37)(38)]. Dans tous les cas, on veillera à stresser le moins possible les embryons. Les enceintes d'essai doivent être conditionnées avec les solutions d'essai pendant au moins 24 h avant le lancement de l'essai. Les conditions d'essai sont résumées à l'appendice 2.

Concentrations d'essai

20. Pour répondre aux exigences statistiques, on doit normalement utiliser cinq concentrations du produit chimique d'essai espacées d'un facteur constant ne dépassant pas 2,2. Si l'on utilise moins de cinq concentrations, on doit fournir une justification. La plus forte concentration testée devrait engendrer de préférence une létalité de 100 % tandis que la plus faible concentration testée ne devrait engendrer aucun effet observable, tel que défini au paragraphe 28. Le fait de procéder à un essai de détermination de l'ordre de grandeur avant l'essai définitif permettra de sélectionner la plage de concentrations appropriée. La détermination de l'ordre de grandeur est généralement faite au moyen de 10 embryons par concentration. Selon les instructions ci-dessous, on doit procéder à l'essai en utilisant des plaques à 24 puits. Si l'on utilise différentes enceintes d'essai (petites boîtes de Pétri, par exemple) ou si l'on teste un plus grand nombre de concentrations, les instructions doivent être adaptées en conséquence.

21. On trouvera au paragraphe 27 et à la figure 1 de l'appendice 4 des informations détaillées et des instructions visuelles concernant la répartition des concentrations dans les plaques à 24 puits.

Témoins

22. Les puits témoins contenant l'eau de dilution doivent servir à la fois de témoins négatifs et de témoins à l'intérieur d'une plaque. Si l'on observe que plus d'un embryon est mort dans le témoin de la plaque, la plaque est rejetée, ce qui réduit le nombre de concentrations utilisées pour déduire la CL_{50}. En cas de rejet d'une plaque entière, la capacité à évaluer et à discerner les effets observés peut devenir plus difficile, en particulier si la plaque rejetée est celle contenant le témoin solvant ou une plaque dans laquelle les embryons traités sont également touchés. Dans le premier cas, l'essai doit être répété. Dans le second cas, la perte de la totalité d'un ou de plusieurs groupe(s) de traitement en raison de la mortalité dans la plaque témoin peut restreindre la possibilité d'évaluer les effets et de déterminer la valeur de la CL_{50}.

23. Un témoin positif à une concentration fixe de 4 mg/l de 3,4-dichloroaniline est prévu pour chaque lot d'œufs utilisé pour l'essai.

24. Si un solvant est utilisé, un groupe supplémentaire de 20 embryons est exposé au solvant sur une plaque à 24 puits séparée, qui sert ainsi de témoin solvant. Pour que l'essai soit considéré comme acceptable, on doit démontrer que le solvant n'a pas d'effets significatifs sur le temps d'éclosion ni sur la survie et qu'il ne produit pas d'autres effets néfastes sur les embryons (cf. paragraphe 7c).

Début de l'exposition et durée de l'essai

25. L'essai démarre dès que possible après que la fécondation des œufs et se termine après 96 h d'exposition. Les embryons doivent être immergés dans les solutions d'essai avant le début de la segmentation du blastodisque ou, au plus tard, avant l'étape des 16 cellules. Pour que l'exposition démarre aussitôt que possible, on sélectionne au moins deux fois le nombre d'œufs nécessaires par groupe de traitement et on les répartit au hasard dans les concentrations et témoins respectifs (exemple: sur des plaques de cristallisation de 100 ml; les œufs doivent être recouverts entièrement) au plus tard 90 minutes après fécondation.

26. Les œufs fécondés viables doivent être séparés des œufs non fécondés puis transférés vers les plaques à 24 puits pré-conditionnées pendant 24 h et

▼M7

remplies de nouveau avec 2 ml/puits de solutions d'essai dans un délai de 180 minutes après la fécondation. On utilise un stéréomicroscope (permettant de préférence un grossissement ≥30×) pour sélectionner des œufs fécondés en phase de segmentation et sans trace d'irrégularités flagrantes lors de la segmentation (asymétrie, formation de vésicules, etc.) ni de lésions du chorion. En ce qui concerne la collecte et la séparation des œufs, on consultera les figures 1 et 3 de l'appendice 3 ainsi que la figure 2 de l'appendice 4.

Répartition des œufs sur les plaques à 24 puits

27. Les œufs sont répartis comme suit sur les plaques à puits (voir également la figure 1 de l'appendice 4)

— 20 œufs sur une plaque pour chaque concentration d'essai;

— 20 œufs servant de témoin solvant sur une plaque (si nécessaire);

— 20 œufs servant de témoin positif sur une plaque;

— 4 œufs immergés dans l'eau de dilution, servant de témoin interne à la plaque, sur chacune des plaques ci-dessus;

— 24 œufs immergés dans l'eau de dilution, servant de témoin négatif sur une plaque.

Observations

28. Les observations apicales faites sur chaque embryon d'essai portent sur: la coagulation des embryons, l'absence de formation de somites, le non-détachement de la queue, l'absence de battements du cœur (tableau 1). Ces observations servent à déterminer la létalité: si l'une des ces observations donne un résultat positif, cela signifie que l'embryon de poisson-zèbre est mort. De plus, l'éclosion est enregistrée chaque jour dans les groupes de traitement et les groupes témoins à partir de 48 h. Les observations sont enregistrées toutes les 24 h, jusqu'à la fin de l'essai.

Tableau 1

Observations apicales de la toxicité aiguë chez les embryons de poisson-zèbre 24 à 96 h après fécondation

	Durées d'exposition			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Embryons coagulés	+	+	+	+
Absence de formation de somites	+	+	+	+
Non-détachement de la queue	+	+	+	+
Absence de battements du cœur		+	+	+

29. *Coagulation de l'embryon:* Les embryons coagulés sont d'un blanc laiteux et apparaissent sombres au microscope (voir la figure 1 de l'appendice 5). Le nombre d'embryons coagulés est déterminé au bout de 24, 48, 72 et 96 h.

30. *Absence de formation de somites:* À 26 ± 1°C, une vingtaine de somites se forment au bout de 24 h (voir la figure 2 de l'appendice 5) chez un embryon de poisson-zèbre se développant normalement. Un embryon normalement développé a des mouvements spontanés (contractions des deux côtés). Ces mouvements spontanés indiquent la formation de somites. L'absence de somites est enregistrée au bout de 24, 48, 72 et 96 h. La non-formation de somites au bout de 24 h peut être due à un retard général de développement. Au bout de 48 h au plus tard, la formation de somites devrait avoir rattrapé son retard. Si ce n'est pas le cas, les embryons sont considérés comme morts.

31. *Non-détachement de la queue:* Chez un embryon de poisson-zèbre se développant normalement, le détachement de la queue (voir la figure 3 de

▼M7

l'appendice 5) du vitellus est observé après élongation postérieure du corps embryonnaire. L'absence de détachement de la queue est enregistrée au bout de 24, 48, 72 et 96 h.

32. *Absence de battements du cœur:* Chez un embryon de poisson-zèbre se développant normalement, à 26 ± 1 °C, les battements du cœur sont visibles au bout de 48 h (voir la figure 4 de l'appendice 5). On sera particulièrement vigilant au moment de noter ce paramètre; en effet, des battements du cœur irréguliers (erratiques) ne doivent *pas* être enregistrés comme létaux. De plus, des battements de cœur visibles sans circulation dans l'aorte abdominale sont considérés comme non létaux. Pour noter ce paramètre, on doit avoir observé des embryons ne montrant pas de battement du cœur avec un grossissement supérieur ou égal à 80× pendant au moins une minute. L'absence de battements du cœur est enregistrée au bout de 48, 72 et 96 h.

33. Les taux d'éclosion de tous les groupes de traitement et les groupes témoins doivent être enregistrés à compter de l'expiration d'un délai de 48 h puis notés dans le rapport. Bien que l'éclosion ne soit pas utilisée pour le calcul de la CL_{50}, elle assure l'exposition de l'embryon sans la fonction de barrière que peut jouer le chorion, et à ce titre elle peut aider à l'interprétation des données.

34. On trouvera dans les appendices 3 et 5 une description détaillée du développement normal (36) et des exemples de développement anormal des embryons de poisson-zèbre.

Dosages analytiques

35. Au début et à la fin de l'essai, on mesure le pH, la dureté totale et la conductivité dans le(s) témoin(s) et dans la concentration d'essai maximale. Dans les essais semi-statiques (essais avec renouvellement), on doit mesurer le pH avant et après le renouvellement de l'eau. La concentration d'oxygène dissous est mesurée à la fin de l'essai dans les témoins négatifs et dans la concentration d'essai maximale avec des œufs viables; les résultats doivent répondre aux critères de validité de l'essai (voir le paragraphe 8f). Si l'on craint que la température ne soit pas la même dans toutes les plaques 24 puits, la température sera mesurée dans trois cuves sélectionnées au hasard. On doit enregistrer la température de préférence en continu au cours de l'essai ou, du moins, quotidiennement.

36. Dans un système statique, la concentration du produit chimique d'essai doit être mesurée au moins à la plus faible et la plus forte des concentrations d'essai, mais de préférence dans tous les traitements, au début et à la fin de l'essai. Dans un système d'essai semi-statique (avec renouvellement) où la concentration du produit chimique d'essai ne devrait pas s'écarter de plus de 20 % des valeurs nominales, il est recommandé d'analyser au moins la plus faible et la plus forte des concentrations d'essai juste après leur préparation et immédiatement avant le renouvellement. Si l'on prévoit que la concentration du produit chimique d'essai s'écartera de plus de 20 % des valeurs nominales, il faut analyser toutes les concentrations d'essai fraichement préparées et avant le renouvellement de la solution. Si le volume à analyser est insuffisant, il peut se révéler utile de fusionner les solutions d'essai ou d'avoir recours à des enceintes de substitution fabriquées dans le même matériau et ayant les mêmes rapports du volume à la surface que les plaques à 24 puits. Il est vivement recommandé que les résultats soient basés sur les concentrations mesurées. Si les concentrations s'écartent de 80-120 % de la valeur nominale, il faut exprimer les concentrations avec effet par rapport à la moyenne géométrique des concentrations mesurées dans les essais semi-statiques; pour de plus amples informations, voir le chapitre 5 du document d'orientation de l'OCDE «Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures» (28).

ESSAI LIMITE

37. Sur la base du mode opératoire décrit dans la présente méthode d'essai, un essai limite peut être conduit à 100 mg/l du produit chimique d'essai ou jusqu'à sa limite de solubilité dans le milieu d'essai (selon la valeur la plus

▼M7

basse), de façon à démontrer que la CL_{50} est supérieure à cette concentration. On devra placer 20 embryons dans le traitement, le témoin positif et, si nécessaire, le témoin solvant ainsi que 24 embryons dans le témoin négatif. Si le pourcentage de létalité à la concentration testée dépasse de 10 % la mortalité dans le témoin négatif (ou le témoin solvant), on doit procéder à une étude complète. Les effets observés doivent être enregistrés. Si la mortalité dépasse 10 % dans le témoin négatif (ou le témoin de solvant), l'essai n'est plus valable et doit être recommencé.

RESULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

38. Dans cet essai, chaque puits est considéré comme un réplicat indépendant pour l'analyse statistique. Les pourcentages d'embryons pour lesquels au moins l'une des observations apicales est positive au bout de 48 et/ou 96 h sont représentés graphiquement en fonction des concentrations d'essai. Pour le calcul des pentes de la courbe, des valeurs de la CL_{50} et des limites de confiance (95 %), on appliquera les méthodes statistiques appropriées (39) et on consultera le document d'orientation de l'OCDE Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data (39).

Rapport d'essai

39. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Produit chimique d'essai:

Substance mono-constituant

— apparence physique, hydrosolubilité, autres propriétés physico-chimiques;

— identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. (y compris la teneur en carbone organique, si cela se justifie).

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges:

— caractérisée, autant que possible p.ex. par l'identité chimique des constituants voir-ci-dessus, la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants.

Organismes d'essai:

— nom scientifique, souche, origine, méthode de collecte des œufs fécondés et manipulations ultérieures.

Conditions d'expérimentation:

— méthode utilisée (par exemple semi-statique/avec renouvellement);

— photopériode;

— protocole de l'essai (nombre d'enceintes d'essai, types de témoins, etc.);

— caractéristiques de l'eau pour l'entretien des poissons (pH, dureté, température, conductivité, oxygène dissous, etc.);

— concentration d'oxygène dissous, pH, dureté totale, température et conductivité des solutions d'essai au début de l'essai et au bout de 96 h);

— méthode de préparation des solutions-mères et des solutions d'essai, ainsi que fréquence du renouvellement;

▼M7

— justification de l'emploi d'un solvant et justification de son choix, s'il ne s'agit pas de l'eau;

— concentrations d'essai nominales et résultat de toutes les analyses visant à déterminer la concentration du produit chimique d'essai dans les cuves d'essai; on notera également dans le rapport le rendement de récupération de la méthode et sa limite de quantification (LQ);

— preuve que les témoins ont répondu aux critères de validité applicables au taux global de survie;

— taux de fécondation des œufs;

— taux d'éclosion dans les groupes de traitement et les groupes témoins.

Résultats:

— la plus forte concentration ne provoquant aucune mortalité durant l'essai;

— la plus faible concentration provoquant 100 % de mortalité durant l'essai;

— la mortalité cumulée pour chaque concentration aux moments d'observation recommandés;

— les valeurs de la CL_{50} à 96 h (éventuellement à 48 h) en ce qui concerne la mortalité, avec des intervalles de confiance de 95 %, si possible;

— un graphique représentant la courbe concentration-mortalité à la fin de l'essai;

— la mortalité dans les témoins (témoins négatifs, témoins à l'intérieur d'une plaque, témoin positif et, le cas échéant, témoin de solvant);

— les données sur le résultat de chacune des quatre observations apicales;

— l'incidence et la description des anomalies morphologiques et physiologiques, s'il y a lieu (voir les exemples de la figure 2, appendice 5);

— les incidents survenus au cours de l'essai et qui ont pu influer sur les résultats;

— l'analyse statistique et le traitement des données (analyse probit, modèle de régression logistique et moyenne géométrique des valeurs de la CL_{50});

— la pente et les limites de confiance du modèle de régression de la courbe concentration-réponse (transformée).

Écarts éventuels par rapport à la présente méthode d'essai et explications correspondantes.

Discussion et interprétation des résultats.

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Série de l'OCDE sur les essais et l'évaluation n° 157, OCDE, Paris.

(2) OCDE (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (annexes). Série de l'OCDE sur les essais et l'évaluation n° 179, OCDE, Paris.

(3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. and Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute

▼M7

fish LC_{50} test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: 87-102.

(4) ISO (2007), Qualité de l'eau – Détermination de la toxicité aiguë des eaux résiduaires vis-à-vis des œufs de poisson-zèbre (*Danio rerio*). ISO 15088:2007, Organisation internationale de normalisation.

(5) Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) — a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38-48.

(6) Schulte, C. and Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test — preliminary results. ATLA 22, 12-19.

(7) Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). PhD-thesis, Technical University of Dresden, Germany.

(8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. and Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: 2087-2102.

(9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 9690-9700.

(10) Kammann, U., Vobach, M. and Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 97-102.

(11) Groth, G., Kronauer, K. and Freundt, K.J. (1994) Effects of *N,N*-diemethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. *In Vitro* 8: 401-406.

(12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. and Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: 878-882.

(13) Nguyen, L.T. and Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: 566-571.

(14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. and Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: 3024-3031.

(15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. and Carr G. J. (2013). Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry 32: 1768-1783. .

(16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.: 149 (2), 196–209

(17) Chapitre C.4 de la présente annexe: Biodégradabilité facile.

(18) Chapitre C.29 de la présente annexe: Biodégradabilité facile, dégagement de CO_2 dans des flacons hermétiquement clos.

(19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology 281: 25-36.

▼M7

(20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Reprod. Toxicol. 33: 133-141.

(21) Incardona, J.P, Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 257: 242-249.

(22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. Toxicol. Appl. Pharmacol. 253: 244-252.

(23) Chapitre C.48 de la présente annexe: Essai à court terme de reproduction des poissons. Voir appendice 4A.

(24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). Toxicol. *in vitro* 23: 1436-1442.

(25) Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klamer, H.J.C., (2001) Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35, 4097–4102.

(26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1676-1682.

(27) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1996), Qualité de l'eau – Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Téléostei, Cyprinidae)] – Partie 3: Méthode avec renouvellement continu. [http://www.iso.org].

(28) OCDE (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Série sur les essais et l'évaluation n° 23, ENV/JM/MONO8200)6, OCDE, Paris.

(29) Laale, H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. J. Fish Biol. 10: 121-173.

(30) Westerfield, M. (2007) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5ème édition. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, USA.

(31) Conseil canadien de protection des animaux (2005), Lignes directrices du CCPA sur: le soin et l'utilisation des poissons en recherche, en enseignement et dans les tests, ISBN: 0-919087-43-4 http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf

(32) Commission européenne (2007), Recommandation de la Commission du 18 juin 2007 concernant des lignes directrices relatives à l'hébergement et aux soins des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques (notifiée sous le numéro C(2007) 2525) (2007/526/CE) [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:EN:PDF]

(33) Union européenne (2010), Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Journal officiel de l'Union européenne, L 276:33-79; 20.10.2010

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:EN:PDF

(34) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). J. Appl. Ichthyol. 2: 173-181.

▼**M7**

(35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253-310.

(36) Chapitre C.2 de la présente annexe Daphnia sp., Essai d'immobilisation immédiate.

(37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect conentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1970-1978

(38) ISO (Organisation internationale de normalisation) (2006), Qualité de l'eau – Lignes directrices relatives à l'interprétation statistique de données écotoxicologiques. Available: [http://www.iso.org].

(39) OCDE (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Série sur les essais et l'évaluation, n° 54, OCDE, Paris.

(40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper «Fish embryo toxicity assays». UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlin. 298 pp.

▼M7

Appendice 1

DEFINITIONS

Effet apical: ayant des effets au niveau de la population.

Blastula: formation cellulaire autour du pôle animal, qui recouvre une certaine partie du vitellus.

Produit chimique: une substance ou un mélange

Épibolie: prolifération massive de cellules principalement épidermiques lors de la phase de gastrulation de l'embryon et mouvement de ces cellules de la face dorsale vers la face ventrale, par lequel les couches de cellules entodermiques s'invaginent et le vitellus se retrouve à l'intérieur de l'embryon.

Essai dynamique: essai avec un flux continu de solutions d'essai dans le système d'essai pendant toute la durée de l'exposition.

Témoin à l'intérieur d'une plaque: témoin interne constitué de quatre puits remplis d'eau de dilution par plaque à 24 puits afin d'identifier la contamination potentielle des plaques par le fabricant ou par le chercheur au cours du protocole, et tout effet de la plaque pouvant influer sur le résultat de l'essai (gradient de température, par exemple).

IUPAC: Union internationale pour la chimie pure et appliquée.

Eau d'élevage: eau dans laquelle est pratiqué l'élevage des poissons adultes.

Concentration létale médiane (LC_{50}): concentration d'un produit chimique d'essai qui devrait provoquer la mort de 50 % des animaux exposés au cours de l'essai.

Essai semi-statique (essai avec renouvellement): essai avec renouvellement régulier des solutions d'essai à l'issue de périodes définies (toutes les 24 h, par exemple).

SMILES: Spécification d'écriture moléculaire linéaire simplifiée

Somite: chez les vertébrés au stade de développement embryonnaire, les somites sont des masses mésodermiques situées de part de d'autre du tube neural, qui produiront ensuite le derme (dermatome), les muscles squelettiques (myotome) et les vertèbres (sclérotome).

Essai statique: essai dans lequel les solutions d'essai restent inchangées pendant toute la durée de l'essai.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai

UVCB: substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques.

▼M7

Appendice 2

ENTRETIEN, ELEVAGE ET CONDITIONS TYPES POUR LES ESSAIS DE TOXICITE AIGÜE SUR EMBRYONS DE POISSON-ZEBRES

Poisson-zèbre (*Danio rerio*)		
Origine de l'espèce		Inde, Birmanie, Malacca, Sumatra
Dimorphisme sexuel		Femelles: ventre proéminent lorsqu'elles portent des œufs Mâles: plus sveltes, teinte orangée entre les rayures bleues longitudinales (particulièrement visible sur la nageoire anale)
Régime alimentaire		Flocons déshydratés (max. 3 % du poids des poissons par jour) 3-5 fois par jour + nauplies d'artémies (du genre *Artemia*) et/ou daphnies de taille appropriée provenant d'une source non contaminée. Les petits crustacés sont une source d'enrichissement de l'environnement et doivent donc faire partie du régime alimentaire, si possible. Pour une qualité de l'eau optimale, les aliments non consommés et les fèces doivent être retirés une heure environ après le repas.
Poids approximatif des poissons adultes		Femelles: 0,65 ± 0,13 g Mâles: 0,5 ± 0,1 g
Entretien des poissons géniteurs parental fish	Intensité de l'éclairage	Ampoules fluorescentes (à large spectre); 10-20 $\mu E/m^2/s$, 540-1080 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire); photopériode: 12-16 h
	Température de l'eau	26 ± 1 °C
	Qualité de l'eau	$O_2 \geq 80$ % de la valeur de saturation, dureté: par exemple, ~ 30-300 mg/l de $CaCO_3$, NO_3^-: ≤ 48mg/l, NH_4^+ et NO_2^-: < 0,001 mg/l, chlore résiduel < 10 µg/l, chlore organique total < 25 ng/l, pH = 6,5-8,5
	Autres critères de qualité de l'eau	Particules < 20 mg/l, carbone organique total < 2 mg/l, pesticides organophosphorés totaux < 50 ng/l, pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés < 50 ng/l
	Contenance des cuves d'entretien	180 l, 1 poisson/l, par exemple
	Purification de l'eau	Permanente (avec filtres à charbon); autres possibilités: combinaisons avec un système d'entretien avec renouvellement semi-statique ou avec un système dynamique avec renouvellement de l'eau en continu
	Rapport mâles/femelles recommandé pour l'élevage	2:1 (ou frai de masse)
Cuves de frai		Par exemple, cuves de 4 l avec fond grillagé en acier et plantes artificielles servant de stimulant pour le frai; coussins chauffants extérieurs, ou frai de masse à l'intérieur des cuves d'entretien.
Structure et apparence des œufs		Chorion stable (soit très transparent, non collant, diamètre d'environ 0,8-1,5 mm)
Taux de frai		Une femelle à maturité fraie au moins 50-80 œufs par jour. Chez certaines souches, les taux de frai peuvent être beaucoup plus élevés. Le taux de fécondation doit être ≥ 70 %. Dans le cas de poissons frayant pour la première fois, les taux de fécondation des œufs peuvent être plus faibles lors des premiers frais.
Type d'essai		Statique, semi-statique avec renouvellement, dynamique, 26 ± 1 °C, enceintes d'essai conditionnées pendant 24 h (plaques à 24 puits avec 2,5-5 ml par cavité, par exemple)

▼M7

Appendice 3

DEVELOPPEMENT NORMAL DU POISSON-ZEBRE A 26°C

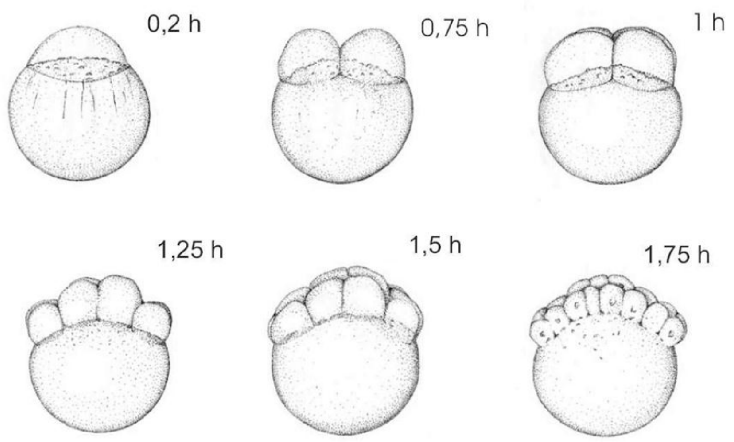


Fig. 1: Sélection de premiers stades de développement du poisson-zèbre (*Danio rerio*): 0,2–1,75 h après la fécondation (Kimmel *et al.*, 1995). On peut utiliser la succession dans le temps des différents stades de développement normal pour diagnostiquer à la fois la fécondation et la viabilité des œufs (voir le paragraphe 25: Sélection des œufs fécondés).

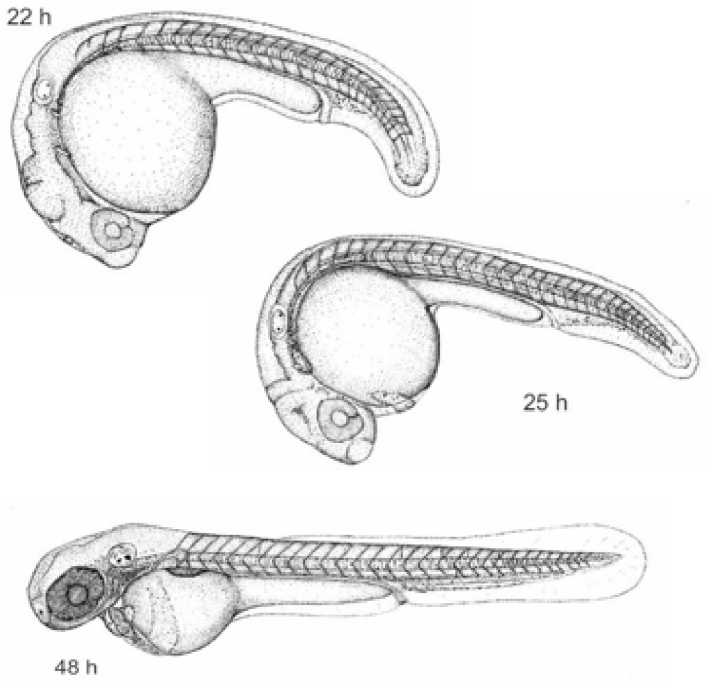


Fig. 2: Sélection de derniers stades de développement du poisson-zèbre (*Danio rerio*) (embryon déchorioné pour une meilleure visibilité): 22–48 h après la fécondation (Kimmel *et al.*, 1995).

▼**M7**

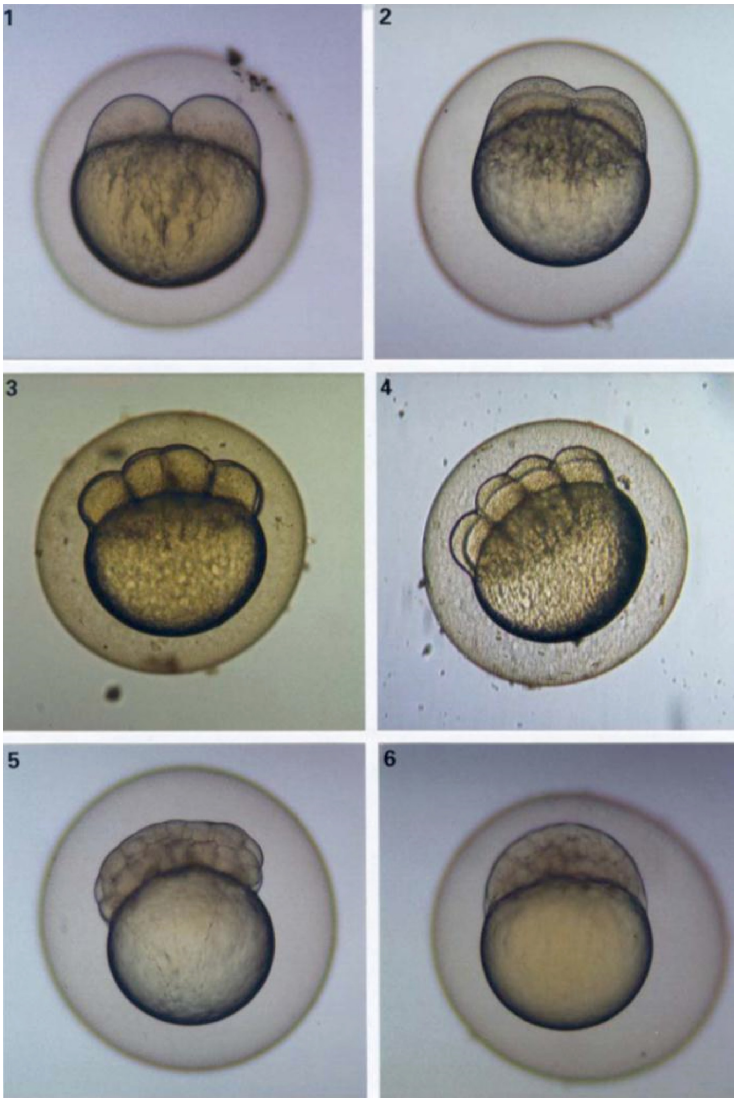


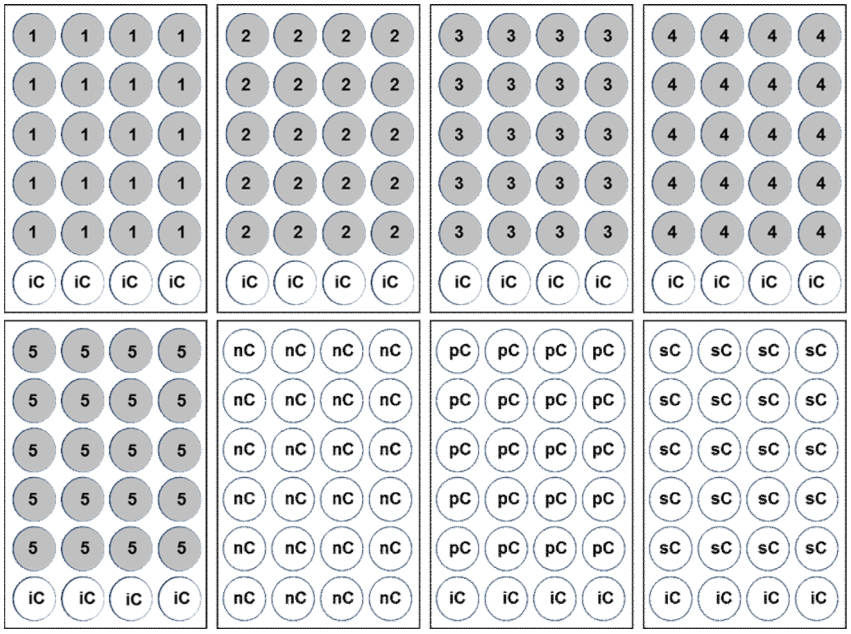
Fig. 3: Développement normal d'un poisson-zèbre (*Danio rerio*) au stade embryonnaire: (1) 0,75 h, stade à 2 cellules; (2) 1 h, stade à 4 cellules; (3) 1,2 h, stade à 8 cellules; (4) 1,5 h, stade à 16 cellules; (5) 4,7 h, début de l'épibolie; (6) 5,3 h, épibolie à 50 % environ [Braunbeck & Lammer 2006 (40)].

▼M7

Appendice 4

Fig. 1

Plan des plaques 24 puits



1-5 = cinq concentrations d'essai/produit chimique;

nC = témoin négatif (eau de dilution);

iC = témoin à l'intérieur d'une plaque (eau de dilution);

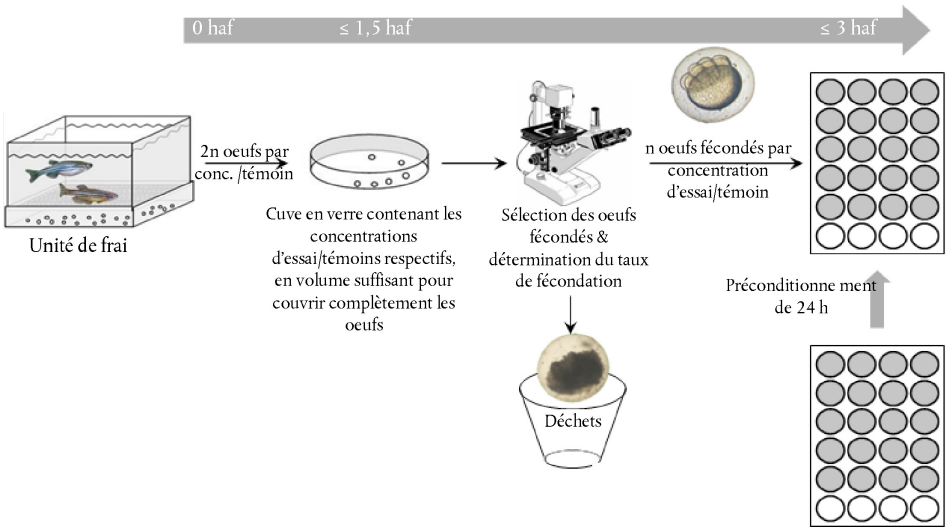
pC = témoin positif (3,4-DCA: 4 mg/l);

sC = témoin de solvant

▼M7

Fig. 2

Schéma du protocole des essais de toxicité chez le poisson-zèbre au stade embryonnaire (de gauche à droite): production d'œufs, collecte des œufs, pré-exposition immédiatement après la fécondation dans des cuves en verre, sélection des œufs fécondés au moyen d'un microscope inversé ou binoculaire et répartition des œufs fécondés sur des plaques à 24 puits préparées avec les concentrations d'essai/témoins respectifs, n = nombre d'œufs nécessaires par concentration d'essai/témoin (20 en l'occurrence), haf = heures après fécondation.



▼M7

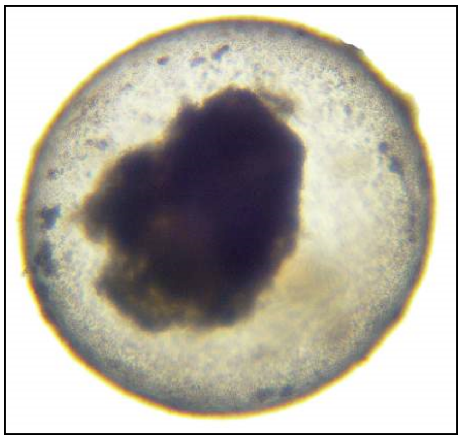
Appendice 5

ATLAS DES PARAMETRES LETAUX POUR L'ESSAI DE TOXICITE CHEZ LE POISSON-ZEBRE AU STADE EMBRYONNAIRE

Les paramètres apicaux ci-dessous donnent des indications sur la toxicité aiguë et, par conséquent, la mort des embryons: *coagulation de l'embryon, non-détachement de la queue, absence de formation de somites* et *absence de détection de battements du cœur*. Les micrographies ci-dessous ont été sélectionnées pour illustrer ces paramètres.

Fig. 1

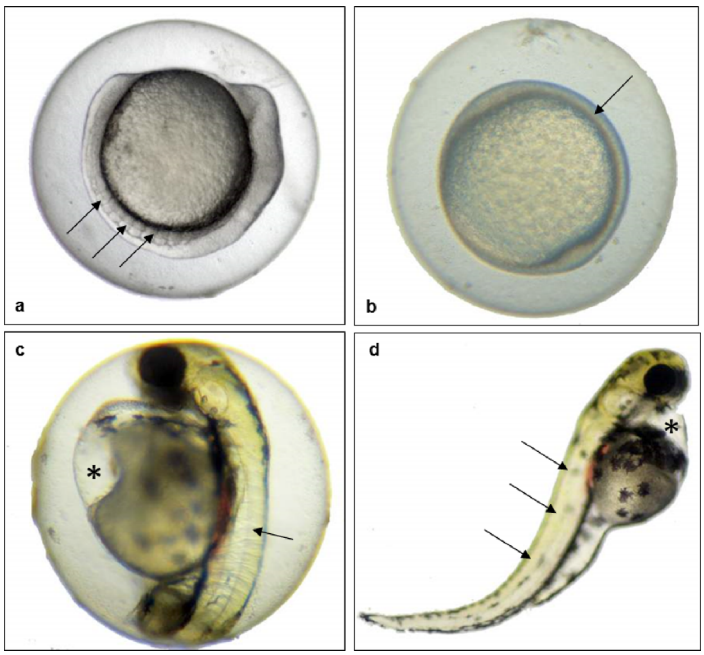
Coagulation de l'embryon:



Par éclairage sur fond clair, on distingue diverses inclusions opaques sur les embryons de poisson-zèbre coagulés.

Fig. 2

Absence de formation de somites

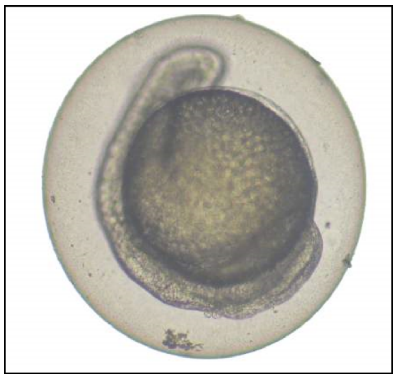


▼M7

Malgré un retard de développement de 10 h environ, l'embryon de poisson-zèbre de 24 h a des somites bien développées (→) en (a) tandis qu'il ne montre aucun signe de formation de somites (→) en (b). On observe la formation de somites bien distinctes (→) chez l'embryon de poisson-zèbre de 48 h en (c) malgré un œdème prononcé du sac vitellin (*) tandis qu'en (d) l'embryon de poisson-zèbre de 96 h ne montre aucun signe de formation de somites (→). On note également la déviation de la colonne vertébrale (scoliose) et l'œdème péricardique (*) chez l'embryon en (d).

Fig. 3

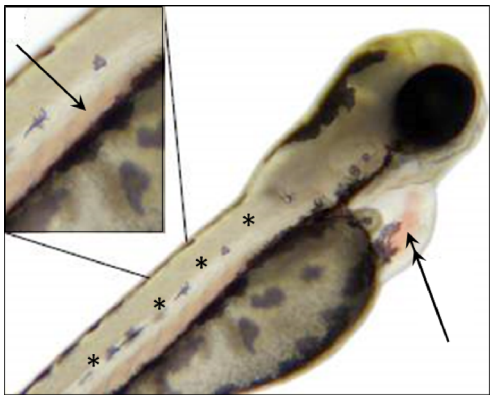
Vue latérale du non-détachement du bourgeon caudal



(a: →; embryon de poisson-zèbre de 96 h). On note également l'absence de vésicule optique (*).

Fig. 4

L'absence de battements du cœur



L'absence de battements du cœur est, par définition, difficile à illustrer au moyen d'une micrographie. La non-convulsion du cœur (double flèche) indique l'absence de battements du cœur. L'immobilité des cellules sanguines, par exemple dans l'aorte abdominale (→ dans l'encadré) n'est pas un indicateur d'absence de battements du cœur. On notera également l'absence de formation de somites dans cet embryon (*, apparence homogène plutôt que segmentaire des tissus musculaires). L'observation pour l'enregistrement d'une absence de battements du cœur doit durer au moins une minute, avec un grossissement supérieur ou égal à 80×.

▼M7

C.50. Essai de toxicité sur *Myriophyllum spicatum* dans un système sans sédiment

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 238 (2014) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Elle a pour objet d'évaluer la toxicité de produits chimiques sur *Myriophyllum spicatum*, espèce de plante aquatique immergée dicotylédone de la famille des Myriophylles. Elle s'inspire d'une méthode d'essai existante de l'ASTM (1), modifiée pour disposer d'un système sans sédiment (2) afin d'estimer l'écotoxicité intrinsèque des produits chimiques d'essai (quelle que soit la manière dont ces produits chimiques se répartissent entre l'eau et le sédiment). Un système d'essai sans sédiment est peu complexe à analyser (il n'y a qu'une phase aqueuse), et les résultats peuvent être analysés parallèlement et/ou par rapport à ceux obtenus dans l'essai sur les espèces du genre *Lemna* (3). En outre, dans les conditions stériles requises, il est possible de minimiser les effets liés aux micro-organismes et aux algues (dégradation/absorption du produit chimique d'essai, etc.). Cet essai ne remplace pas les autres essais de toxicité aquatique, mais doit les compléter de manière à permettre une évaluation plus complète des dangers et des risques pour la flore aquatique. La méthode d'essai a été validée par un essai circulaire (4).

2. Les modes opératoires avec renouvellement (essai semi-statique) et sans renouvellement (essai statique) de la solution d'essai sont décrits en détail. En fonction des objectifs de l'essai et des exigences réglementaires, la méthode semi-statique est conseillée, notamment pour les substances qui disparaissent rapidement de la solution par volatilisation, adsorption, photodégradation, hydrolyse, précipitation ou biodégradation. La référence (5) donne des indications supplémentaires. La présente méthode d'essai s'applique aux substances, qui peuvent être testées soit isolément, cas pour lequel la méthode d'essai a été validée, comme l'indique le rapport de l'essai circulaire (4), soit aux préparations ou mélanges connus. Si l'on teste un mélange, il convient d'en identifier et quantifier les composants dans toute la mesure du possible. La méthode d'essai sur *Myriophyllum spicatum* dans un système sans sédiment complète la l'essai de toxicité sur *Myriophyllum spicatum* dans un système eau-sédiment (6). Avant d'utiliser la méthode d'essai sur un mélange pour générer des données dans une perspective réglementaire, on examinera si, et si oui pourquoi, elle peut fournir des résultats adéquats à cette fin. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé.

PRINCIPE DE L'ESSAI

3. Des cultures de *Myriophyllum spicatum* en développement continu (uniquement dans le milieu d'Andrews modifié, voir appendice 2) sont mises en présence de différentes concentrations du produit chimique d'essai pendant 14 jours dans un système d'essai sans sédiment, sous forme de monocultures. L'essai vise à quantifier les effets du produit chimique sur le développement végétatif pendant cette période, d'après l'évaluation d'une série de variables de mesure. Ces variables sont la croissance de la longueur de la tige, celle des branches latérales et des racines et l'évolution des poids frais et sec ainsi que l'augmentation du nombre de verticilles. Par ailleurs, l'essai tient compte de modifications qualitatives particulières chez les organismes d'essai, telles qu'une malformation, une chlorose et une nécrose indiquées par un jaunissement ou une coloration blanche et brune. Pour quantifier les effets imputables au produit chimique, la croissance observée dans les solutions d'essai est comparée aux valeurs déterminées chez les témoins et la concentration induisant un pourcentage donné d'inhibition de la croissance est déterminée et exprimée en termes de CE_x, où «x» peut correspondre à n'importe quelle valeur exigée par la réglementation, par exemple CE_{10}, CE_{20} et CE_{50}. Notons que les estimations de la CE_{10} et de la CE_{20} ne sont fiables et appropriées que dans les essais où les coefficients de variation établis pour les plantes témoins sont inférieurs au niveau d'effet recherché; pour la CE_{20}, cela signifie que ces coefficients de variation doivent rester sous la barre des 20 %.

4. On détermine le taux de croissance spécifique moyen (estimé à partir de la longueur de la tige principale et la mesure de trois autres variables) ainsi que

▼M7

le rendement (estimé à partir de l'accroissement de la tige principale et la mesure de trois autres variables) chez les plantes témoins et les plantes traitées. Le taux de croissance spécifique (t) et le rendement (r) sont ensuite utilisés pour déterminer la C_xE_t (par exemple $C_{10}E_t$, $C_{20}E_t$, $C_{50}E_t$) et la C_xE_r (par exemple, $C_{10}E_r$, $C_{20}E_r$, $C_{50}E_r$).

5. En outre, la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et la concentration sans effet observé (CSEO) peuvent être déterminées par un calcul statistique.

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE D'ESSAI

6. Il conviendrait de disposer d'une méthode analytique suffisamment sensible pour quantifier le produit chimique d'essai dans le milieu d'essai. Parmi les données sur le produit chimique d'essai qui pourraient servir à établir les conditions expérimentales figurent la formule structurale, la pureté et les impuretés, l'hydrosolubilité, la stabilité dans l'eau et à la lumière, la constante d'acidité (pK_a), le coefficient de partition octanol-eau (K_{oe}), la pression de vapeur et la biodégradabilité. L'hydrosolubilité et la pression de vapeur peuvent être utilisées pour calculer la constante de Henry, qui indiquera si des pertes appréciables de produit chimique d'essai risquent de se produire durant l'essai. On saura ainsi s'il y a lieu de prendre des mesures particulières pour limiter ces pertes. Si la solubilité et la stabilité du/des produit(s) chimique(s) d'essai ne sont pas connues avec certitude, il est recommandé de les évaluer dans les conditions de l'essai, c'est-à-dire dans le milieu expérimental ainsi qu'à la température et sous le régime d'éclairage appliqués durant l'essai.

7. Il est particulièrement important de maîtriser le pH du milieu d'essai, notamment pour tester des métaux ou des produits chimiques sensibles à l'hydrolyse. Un document d'orientation de l'OCDE (5) fournit de plus amples informations supplémentaires pour les essais rendus difficiles par les propriétés physico-chimiques du produit chimique.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

8. Pour garantir la validité de l'essai, il faut que la longueur de la tige principale soit multipliée par deux en moins de 14 jours dans le groupe témoin. Si l'on fait appel aux milieux et aux conditions expérimentales décrits dans la présente méthode d'essai, ce critère peut être satisfait en régime statique ou semi-statique.

9. Dans les cultures témoins, le coefficient de variation moyen du rendement basé sur la mesure du poids frais de la tige (entre le début et la fin de l'essai) et d'autres variables de mesure (voir paragraphe 37) ne doit pas dépasser 35 % entre les réplicats.

10. Plus de 50 % des réplicats du groupe témoin sont maintenus stériles pendant les 14 jours d'exposition; on ne doit donc pas y observer de contamination par d'autres organismes comme des algues, des champignons ou des bactéries (la solution doit être limpide). *Note*: Le rapport de l'essai circulaire (4) fournit des indications sur la façon d'évaluer la stérilité.

PRODUIT CHIMIQUE DE RÉFÉRENCE

11. Un ou plusieurs produits chimiques de référence, comme le 3,5-dichlorophénol utilisé dans l'essai circulaire (4), peuvent servir à vérifier la procédure d'essai: sur la base des résultats de l'essai circulaire, les valeurs moyennes de CE_{50} du 3,5-DCP pour les différentes variables de réponse (voir paragraphes 37-41 de la présente méthode d'essai) sont comprises entre 3,2 mg/l et 6,9 mg/l (pour les précisions concernant l'intervalle de confiance pour ces valeurs, voir le rapport de l'essai circulaire). Il est conseillé de tester le produit chimique de référence au moins deux fois par an ou, si l'essai est conduit moins fréquemment, parallèlement à la détermination de la toxicité du produit chimique d'essai.

▼M7

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

12. Tout le matériel entrant en contact avec les milieux d'essai doit être en verre ou fait d'un autre matériau chimiquement inerte. La verrerie destinée aux cultures et à l'essai doit être stérile et nettoyée de tous les contaminants chimiques risquant d'être relargués dans le milieu d'essai. Les récipients d'essai doivent être suffisamment longs pour que la tige des plantes témoins puisse se développer dans la phase aqueuse sans en atteindre la surface à la fin de l'essai. Il est conseillé d'utiliser des tubes à essai en verre borosilicaté à parois épaisses et à bords droits, d'un diamètre interne d'environ 20 mm et d'une longueur proche de 250 mm, et munis de bouchons en aluminium.

13. Étant donné que le milieu d'Andrews modifié contient du sucrose (qui stimule la croissance des champignons et des bactéries), les solutions d'essai sont préparées en conditions stériles. L'ensemble des liquides et du matériel expérimental est stérilisé avant utilisation. Cette stérilisation est effectuée par traitement à l'air chaud (210 °C) pendant 4 heures, ou durant 20 minutes en autoclave à 121 °C. D'autre part, tous les récipients, fioles, boîtes et autres équipements sont passés à la flamme sur une paillasse stérile avant d'être utilisés.

14. Les récipients d'essai et ceux contenant les cultures ne doivent pas être conservés ensemble. Le meilleur moyen d'y parvenir consiste à les garder dans des enceintes de croissance, des incubateurs ou des pièces séparés. L'éclairage et la température doivent être contrôlables et maintenus à un niveau constant.

Organisme d'essai

15. *Myriophyllum spicatum* est une espèce de plante aquatique immergée dicotylédone de la famille des Myriophylles. Entre juin et août, elle produit de discrètes fleurs roses et blanches qui pointent à la surface de l'eau. Les plantes sont enracinées dans le sol grâce à un système de rhizomes robustes. Elles poussent dans tout l'hémisphère nord dans des eaux stagnantes eutrophiques mais non polluées et plutôt calcifères qui contiennent un substrat boueux. *Myriophyllum spicatum* préfère les eaux douces, mais se trouve aussi en eau saumâtre.

16. L'essai de toxicité dans un système sans sédiment fait appel à des plantes stériles. Si le laboratoire d'essai n'a pas l'habitude de cultiver *Myriophyllum spicatum*, il peut s'approvisionner en matériel végétal stérile auprès d'un autre laboratoire; il est aussi possible de prélever des spécimens dans la nature ou de les acheter dans le commerce, mais le matériel végétal ne sera pas stérile. Si les myriophylles sont prélevés dans la nature, il faut vérifier qu'il s'agit du taxon souhaité. Les plantes obtenues dans la nature ou le commerce doivent être stérilisées (1) et cultivées dans le même milieu que celui de l'essai pendant au moins huit semaines avant l'utilisation. Les sites naturels où sont prélevées les cultures de départ seront exempts de sources de contamination manifestes. Lors des prélèvements de *Myriophyllum spicatum* dans la nature, il faut très minutieusement veiller à collecter l'espèce voulue, en particulier dans les régions où ce taxon peut former des hybrides avec d'autres Myriophylles. Si c'est un autre laboratoire qui fournit les végétaux, ces derniers sont cultivés dans des conditions similaires pendant au moins trois semaines. On consignera systématiquement l'origine du matériel végétal et l'espèce utilisée pour l'essai.

17. La qualité et l'uniformité des plantes utilisées pour l'essai influeront significativement sur le résultat de ce dernier, aussi les spécimens doivent-ils être choisis avec soin. On utilisera des plantes jeunes, en croissance rapide et dépourvues de lésions visibles ou de parties décolorées (chlorose). L'appendice 4 fournit des précisions sur la préparation de l'organisme d'essai.

Culture

18. Afin d'alléger le travail d'entretien des cultures (par exemple lorsqu'aucun essai n'est prévu sur *Myriophyllum* durant un certain temps), les cultures peuvent être gardées sous un éclairage et à une température réduits ($50\ \mu E.m^{-2} \cdot s^{-1}$, 20 ± 2 °C). L'appendice 3 fournit des précisions sur la culture.

▼M7

19. À partir de 21 jours et au moins 14 jours avant l'essai, un nombre suffisant d'organismes d'essai est transféré aseptiquement dans un milieu stérile fraîchement préparé, et mis en préculture pendant 14 à 21 jours dans les conditions de l'essai. L'appendice 4 fournit des précisions sur la préparation de la préculture.

Milieu expérimental

20. Il est recommandé d'utiliser un seul milieu nutritif pour *Myriophyllum spicatum* dans le cadre d'un système expérimental sans sédiment, tel que décrit à l'appendice 2. Il est conseillé de modifier le milieu d'Andrews pour la culture de *Myriophyllum spicatum* et pour les essais sur cette espèce, conformément aux indications de la référence (1). Le milieu d'Andrews modifié est préparé à partir de cinq solutions mères nutritives préparées séparément et auxquelles on ajoute du sucrose à hauteur de 3 %. L'appendice 2 fournit des précisions sur la préparation du milieu.

21. Les solutions d'essai sont obtenues à partir du milieu d'Andrews modifié concentré dix fois puis dilué selon ce qui convient. La composition de ce milieu est indiquée à l'appendice 2.

Solutions d'essai

22. Les solutions d'essai sont généralement préparées par dilution d'une solution mère. Les solutions mères de la substance d'essai sont habituellement obtenues par dissolution du produit chimique dans de l'eau déminéralisée (distillée ou désionisée). L'apport de nutriments est assuré par l'utilisation de milieu d'Andrews modifié concentré dix fois.

23. Les solutions mères du produit chimique d'essai peuvent être stérilisées par autoclavage à 121 °C durant 20 minutes ou par filtration stérile, à condition que la technique de stérilisation employée ne dénature pas le produit chimique. Il est également possible de préparer les solutions d'essai avec de l'eau déminéralisée ou un milieu stérile, dans des conditions stériles. On tiendra compte de la thermostabilité et de l'adsorption sur différentes surfaces pour choisir la méthode de stérilisation des solutions mères du produit chimique d'essai. C'est la raison pour laquelle il est conseillé de préparer les solutions mères en conditions stériles, c'est-à-dire en utilisant du matériel stérile pour dissoudre le produit chimique d'essai en conditions stériles (par exemple stérilisation à la flamme, hottes à flux laminaire, etc.) dans de l'eau stérile. Cette technique de préparation de solutions mères stériles peut être mise en œuvre tant pour les substances que pour les mélanges.

24. Normalement, la concentration maximale du produit chimique d'essai ne peut dépasser son hydrosolubilité dans les conditions expérimentales. Pour les produits chimiques d'essai peu solubles dans l'eau, il est parfois nécessaire de préparer une solution mère concentrée ou une dispersion du produit chimique à l'aide d'un solvant organique ou d'un dispersant afin de faciliter l'ajout de quantités précises du produit chimique d'essai dans le milieu ainsi que sa dispersion et sa dissolution. Le recours à ces auxiliaires doit être évité dans la mesure du possible. Les solvants ou les dispersants auxiliaires ne doivent pas induire de phytotoxicité. L'acétone et le diméthylformamide sont des exemples de solvants courants qui n'engendrent aucune phytotoxicité à des concentrations allant jusqu'à 100 µl/l. Si l'on utilise un solvant ou un dispersant, sa concentration finale doit être limitée et ne peut pas dépasser 100 µl/l; elle doit être identique dans tous les récipients traités et témoins et spécifiée dans le rapport. La référence (5) donne des indications supplémentaires sur l'utilisation des dispersants.

Groupes traités et groupes témoins

25. Un essai de détermination de l'ordre de grandeur donnera une première idée de la toxicité du produit chimique d'essai sur *Myriophyllum spicatum* et permettra de sélectionner les concentrations expérimentales adéquates. L'essai définitif

▼M7

doit normalement porter sur cinq (comme dans l'essai d'inhibition de la croissance de *Lemna,* au chapitre C.26 de la présente annexe) à sept concentrations d'essai formant une série géométrique. Ces concentrations sont choisies de manière que les valeurs de la CSEO et de la CE_{50} soient comprises dans la plage des concentrations d'essai (voir ci-dessous). Il est préférable que les concentrations d'essai ne soient pas espacées d'un facteur supérieur à 3,2, mais on peut appliquer un facteur plus élevé si la courbe concentration-effet a une pente faible. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. Il convient d'inclure au minimum cinq réplicats par concentration d'essai.

26. Le choix de la plage des concentrations expérimentales (pour la détermination de l'ordre de grandeur et/ou l'essai de toxicité définitif) doit tenir compte des aspects suivants:

Pour déterminer la CE_x, les concentrations expérimentales doivent encadrer la valeur de la CE_x afin que le niveau de confiance soit suffisant. Par exemple, s'il s'agit d'estimer la CE_{50}, la concentration expérimentale la plus élevée doit dépasser la valeur de la CE_{50}. Si la CE_{50} se situe en dehors de la plage des concentrations d'essai, les intervalles de confiance seront importants et il risque d'être impossible d'évaluer correctement la validité de l'ajustement statistique du modèle.

S'il s'agit d'estimer la CMEO et la CSEO, la plus petite concentration d'essai doit être suffisamment faible pour que la croissance des myriophylles traités ne soit pas ralentie de manière significative par rapport à celle des témoins. De plus, la concentration d'essai la plus élevée doit être suffisamment importante pour que la croissance du groupe exposé soit significativement inférieure à celle des témoins. Si ce n'est pas le cas, l'essai devra être répété pour une plage de concentrations différente (à moins que la concentration la plus élevée atteigne la limite de solubilité ou la concentration limite supérieure autorisée, par exemple 100 mg/l).

27. Chaque essai doit inclure des témoins sans produit chimique d'essai mais identiques aux récipients traités pour ce qui est du milieu nutritif, de l'organisme d'essai (le matériel végétal choisi sera aussi homogène que possible et constitué de branches latérales fraîches obtenues dans les précultures, ramenées à 2,5 cm à partir de la base), des conditions environnementales et des procédures. Si l'on utilise un solvant ou un dispersant auxiliaire, il faut inclure un témoin supplémentaire contenant le solvant ou le dispersant à la même concentration que dans les récipients contenant le produit chimique d'essai. Le nombre de réplicats des récipients témoins (et des récipients contenant le solvant, le cas échéant) doit être au moins égal à dix.

28. Si la détermination de la CSEO n'est pas requise, le dispositif expérimental peut être modifié en augmentant le nombre de concentrations et en réduisant le nombre de réplicats par concentration. Cependant, le nombre de réplicats des témoins doit toujours s'élever à dix minimum.

Exposition

29. Les branches latérales fraîches obtenues en préculture et raccourcies à 2,5 cm en partant de la base sont réparties de façon aléatoire entre les récipients d'essai en conditions aseptiques; chaque récipient expérimental doit contenir une branche latérale de 2,5 cm dont une extrémité présente un méristème apical. Le matériel végétal choisi doit être de qualité identique dans tous les récipients expérimentaux.

30. L'emplacement des récipients expérimentaux dans l'incubateur doit être aléatoire, afin de réduire au minimum l'influence des différences spatiales d'intensité lumineuse ou de température. La disposition des récipients au moment d'effectuer les observations est également régie par un plan en blocs ou une procédure aléatoire (ou un repositionnement plus fréquent des récipients).

31. Si un essai de stabilité préliminaire montre que la concentration du produit chimique d'essai ne peut être maintenue (la concentration mesurée est inférieure à 80 % de la concentration mesurée initialement) sur la durée de l'essai (14 jours), une méthode semi-statique est recommandée. Dans ce cas, les

▼M7

plantes doivent être exposées à des solutions témoins et des solutions d'essai fraîchement préparées au moins une fois au cours de l'essai (par exemple le jour 7). La fréquence de l'exposition à un milieu renouvelé dépendra de la stabilité du produit chimique d'essai; une fréquence plus élevée peut s'avérer nécessaire pour maintenir des concentrations presque constantes dans le cas de produits chimiques très instables ou volatiles.

32. La présente méthode d'essai n'aborde pas le scénario d'exposition fondé sur une application foliaire (pulvérisation).

Conditions de l'essai

33. On applique un éclairage fluorescent blanc chaud et/ou froid pour obtenir une intensité lumineuse comprise entre 100 et 150 $\mu E.m^{-2} \cdot s^{-1}$ en termes de rayonnement photosynthétiquement actif (400-700 nm) mesuré à des points équidistants de la source de lumière, par exemple le fond des récipients d'essai (soit l'équivalent de 6 000 à 9 000 lux environ), avec un cycle alternant 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. La méthode de détection et de mesure de la lumière, notamment le type de capteur, jouera sur la valeur mesurée. Les capteurs sphériques (qui détectent la lumière provenant de tous les angles situés au-dessus et en dessous du plan de mesure) et les capteurs «cosinus» (qui détectent la lumière provenant de tous les angles situés au-dessus du plan de mesure) sont préférables aux capteurs unidirectionnels et afficheront des valeurs plus élevées pour une source lumineuse multiple comme celle qui est décrite ici.

34. La température des récipients d'essai est maintenue à 23 ± 2 °C. Il faudra être particulièrement attentif aux variations du pH dans certains cas particuliers, notamment pour tester des produits chimiques instables ou des métaux; le pH devra rester dans une fourchette de 6 à 9. On trouvera des indications supplémentaires dans le document (5).

Durée

35. L'essai prend fin 14 jours après le transfert des plantes dans les récipients expérimentaux.

Mesures et déterminations analytiques

36. Au début de l'essai, la longueur de la tige principale de l'organisme d'essai est de 2.5 cm (voir paragraphe 29); on la mesure à l'aide d'une règle (voir l'appendice 4) ou par photographie et analyse d'image. La longueur de la tige principale de l'organisme d'essai, qu'il semble normal ou non, doit être déterminée au début de l'essai, au moins une fois pendant la période d'exposition de 14 jours, puis à la fin de l'essai. Note: Pour les laboratoires qui ne peuvent pas faire d'analyse d'image, il est également possible d'utiliser une règle stérile pour mesurer la longueur de la tige principale en début d'essai et pendant l'exposition, à condition que la paillasse ait été stérilisée avant de placer les végétaux dans les récipients expérimentaux. Il convient de noter les changements observés dans le développement des plantes, notamment en ce qui concerne la déformation des tiges, l'apparence, les signes de nécrose, de chlorose, de rupture ou de perte de flottabilité, ainsi que l'aspect et la longueur des racines. On consignera également les caractéristiques notables du milieu expérimental, par exemple la présence d'éléments non dissous ou le développement d'algues, de champignons ou de bactéries dans le récipient d'essai.

37. Outre la détermination de la longueur de la tige principale au cours de l'essai, il convient d'évaluer les effets du produit chimique d'essai sur au moins trois des variables de mesure suivantes:

i. Longueur totale des branches latérales

ii. Longueur totale des tiges

iii. Longueur totale des racines

iv. Poids frais

v. Poids sec

vi. Nombre de verticilles

▼M7

Note 1: Les observations réalisées pendant l'essai de détermination de l'ordre de grandeur peuvent aider à choisir des variables supplémentaires pertinentes parmi les six énumérées ci-dessus.

Note 2: Il est hautement souhaitable de déterminer les poids frais et sec (paramètres iv et v).

Note 3: Étant donné que le sucrose et la lumière (exposition des racines à la lumière durant l'essai) sont susceptibles d'influencer les vecteurs de l'auxine (hormone de croissance végétale), et que certains produits chimiques ont des modes d'action similaires à ceux de l'auxine, l'intérêt de mesurer les effets sur les racines (paramètre iii) est discutable.

Note 4: Les résultats de l'essai circulaire montrent que pour la longueur totale des branches latérales (paramètre i), les coefficients de variation sont élevés (> 60 %). Quoi qu'il en soit, la longueur totale des branches latérales est comprise dans la longueur totale des tiges (paramètre ii), variable pour laquelle les coefficients de variation sont plus acceptables car ils restent inférieurs à 30 %.

Note 5: Il découle des considérations qui précèdent que les principales variables conseillées sont la longueur totale des tiges, le poids frais et le poids sec (paramètres ii, iv et v); le suivi du nombre de verticilles (paramètre vi) est laissé à la discrétion de l'opérateur.

38. La longueur de la tige principale et le nombre de verticilles présentent l'avantage de pouvoir être déterminés pour chaque récipient traité ou témoin au début, au cours et à la fin de l'essai par photographie et analyse d'image, bien qu'une règle (stérile) puisse aussi convenir.

39. La longueur totale des branches latérales, la longueur totale des racines (qui correspondent respectivement à la somme des longueurs de toutes les branches latérales et de toutes les racines) et la longueur totale des tiges (qui correspond à la somme de la longueur de la tige principale et de la longueur totale des branches latérales) peuvent être mesurées avec une règle à l'issue de l'exposition.

40. On détermine les poids frais et/ou sec au début de l'essai à l'aide d'un échantillon des précultures représentatif des végétaux utilisés pour lancer l'essai; à la fin de l'essai, ces poids sont déterminés à partir du matériel végétal contenu dans chaque récipient traité ou témoin.

41. La longueur totale des branches latérales, la longueur totale des tiges, la longueur totale des racines, le poids frais, le poids sec et le nombre de verticilles peuvent être déterminés de la manière suivante:

i. Longueur totale des branches latérales: La longueur des branches latérales peut être déterminée en mesurant toutes les branches latérales avec une règle à la fin de l'exposition. La longueur totale des branches latérales correspond à la somme des longueurs de toutes les branches latérales de chaque récipient traité ou témoin.

ii. Longueur totale des tiges: La longueur de la tige principale peut être déterminée par analyse d'image ou à l'aide d'une règle. La longueur totale des tiges correspond à la somme de la longueur totale des branches latérales et de la longueur de la tige principale de chaque récipient traité ou témoin à la fin de l'exposition.

iii. Longueur totale des racines: La longueur des racines peut être déterminée en mesurant toutes les racines avec une règle à la fin de l'exposition. La longueur totale des racines correspond à la somme des longueurs de toutes les racines de chaque récipient traité ou témoin.

iv. Poids frais: Le poids frais peut être déterminé en pesant les organismes d'essai à la fin de l'exposition. La totalité du matériel végétal contenu dans chaque récipient traité ou témoin est rincé à l'eau distillée puis séché en le tamponnant avec du papier cellulose. Après cette étape de

▼M7

préparation, on obtient le poids frais par pesée. La biomasse de départ (poids frais) est déterminée à partir d'un échantillon d'organisme d'essai issu du même lot que les plantes placées dans les récipients expérimentaux.

v. Poids sec: Après les préparations destinées à la détermination du poids frais, les organismes d'essai sont séchés à 60 °C jusqu'à poids constant. Cette masse correspond au poids sec. La biomasse de départ (poids sec) est déterminée à partir d'un échantillon d'organisme d'essai issu du même lot que les plantes placées dans les récipients expérimentaux.

vi. Nombre de verticilles: On compte tous les verticilles sur la tige principale.

Fréquence des mesures et des déterminations analytiques

42. Avec un dispositif en conditions statiques, le pH de chaque récipient traité doit être mesuré au début et à la fin de l'essai. Si le dispositif est en conditions semi-statiques, le pH est mesuré dans chaque lot de «nouvelle» solution expérimentale avant chaque renouvellement ainsi que dans les solutions «utilisées» correspondantes.

43. Il convient de mesurer l'intensité lumineuse dans l'enceinte de croissance, dans l'incubateur ou dans la pièce à des points équidistants de la source de lumière et des organismes d'essai. Ces mesures sont effectuées au moins une fois pendant l'essai. La température du milieu est mesurée au moins une fois par jour dans un récipient d'essai supplémentaire gardé dans les mêmes conditions que les autres dans l'enceinte de croissance, l'incubateur ou la pièce (ou mesurée en continu par un enregistreur de données).

44. Au cours de l'essai, les concentrations du/des produit(s) chimique(s) d'essai sont déterminées à des intervalles appropriés. Dans les essais statiques, il faut déterminer les concentrations au moins au début et à la fin de l'essai.

45. Dans les essais semi-statiques, où l'on s'attend à ce que les concentrations du/des produit(s) chimique(s) d'essai ne restent pas dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale, il est nécessaire d'analyser toutes les solutions d'essai nouvellement préparées et les mêmes solutions à chaque renouvellement. Néanmoins, pour les essais où la concentration du/des produit(s) chimique(s) d'essai mesurée initialement ne se situe pas dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale, mais où suffisamment d'indices attestent que les concentrations initiales sont répétables et stables (c'est-à-dire dans l'intervalle de 80-120 % de la concentration initiale), les analyses chimiques peuvent n'être effectuées qu'aux concentrations d'essai maximale et minimale. Dans tous les cas, la détermination des concentrations du produit chimique d'essai avant le renouvellement pourra n'être effectuée que dans un réplicat de chaque concentration expérimentale (ou dans un récipient dans lequel on aura mélangé le contenu de tous les réplicats).

46. S'il s'avère que la concentration d'essai a pu être maintenue tout au long de l'essai dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale ou mesurée initialement, l'analyse des résultats peut s'appuyer sur les valeurs nominales ou mesurées initialement. Si l'écart à la concentration nominale ou mesurée initialement est supérieur à ± 20 %, l'analyse des résultats devra reposer sur la moyenne géométrique de la concentration relevée durant l'exposition ou sur des modèles décrivant le déclin de la concentration du produit chimique d'essai (5).

Essai limite

47. Dans certaines circonstances, par exemple lorsqu'un essai préliminaire indique que le produit chimique d'essai n'entraîne aucun effet toxique à des concentrations allant jusqu'à 100 mg/l ou jusqu'à sa limite de solubilité dans le milieu expérimental, ou dans le cas d'une formulation à sa limite de dispersion, on peut conduire un essai limite afin de comparer les réponses

▼M7

d'un groupe témoin avec celles d'un groupe traité (à 100 mg/l ou à une concentration égale à la limite de solubilité). Il est fortement recommandé d'étayer cet essai par une analyse de la concentration d'exposition. Tous les critères de validité et conditions expérimentales décrits précédemment s'appliquent à l'essai limite, si ce n'est que le nombre de réplicats de traitement doit être doublé. La croissance des plantes dans le groupe témoin et le groupe traité peut être analysée au moyen d'un test statistique permettant de comparer les moyennes, par exemple un test t de Student.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Variables de réponse

48. L'objectif de cet essai est d'établir les effets d'un produit chimique d'essai sur le développement végétatif de *Myriophyllum spicatum*. La présente méthode d'essai décrit deux variables de réponse.

a) Taux de croissance spécifique moyen: cette variable est calculée en fonction de l'évolution logarithmique de la longueur de la tige principale, ainsi que de l'évolution logarithmique d'autres paramètres de mesure, à savoir la longueur totale des tiges, le poids frais, le poids sec ou le nombre de verticilles au cours du temps (variables exprimées par jour), dans les témoins et dans chaque groupe traité. *Note*: Pour le paramètre de mesure longueur totale des branches latérales et longueur totale des racines, il n'est pas possible de calculer le taux de croissance spécifique moyen. Au début de l'essai, la plante n'a ni branches latérales, ni racines (conformément à la méthode de préparation à partir des précultures), or le taux de croissance spécifique moyen ne peut être calculé avec une valeur initiale nulle.

b) Rendement: cette variable est calculée en fonction de l'évolution de la longueur de la tige principale, ainsi que d'autres paramètres de mesure — à savoir, de préférence, la longueur totale des tiges, le poids frais, le poids sec ou le nombre de verticilles, ainsi que d'autres paramètres, si cela paraît utile — dans les témoins et dans chaque groupe traité jusqu'à la fin de l'essai.

49. Les estimations de la toxicité doivent reposer sur la longueur de la tige principale et sur trois variables de mesure supplémentaires (de préférence longueur totale des tiges, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles, voir paragraphe 37 et les notes 2, 4 et 5 qui y figurent), car certains produits chimiques sont susceptibles d'affecter plus fortement les autres variables de mesure que la longueur de la tige principale. Cet effet n'est pas visible si l'on ne calcule que la longueur de la tige principale.

Taux de croissance spécifique moyen

50. Le taux de croissance spécifique moyen durant une période donnée correspond à l'accroissement logarithmique des variables de croissance, à savoir la longueur de la tige principale et trois autres variables de mesure (longueur totale des tiges, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles), grâce à la formule ci-dessous, appliquée à chaque réplicat des groupes témoins et traités:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln\left(N_j\right) - \ln\left(N_i\right)}{t}$$

où:

μ_{i-j}: taux de croissance spécifique moyen du temps i au temps j

N_i: variable de mesure dans le récipient témoin ou traité au temps i

N_j: variable de mesure dans le récipient témoin ou traité au temps j

t: période de temps comprise entre i et j

▼M7

Pour chaque groupe traité ou témoin, calculer un taux de croissance moyen et les estimations de la variance.

51. On calcule le taux de croissance spécifique moyen sur l'ensemble de la période d'essai (le temps «i» mentionné dans la formule ci-dessus correspond au début de l'essai et le temps «j» à la fin de l'essai). Pour chaque concentration d'essai et chaque témoin, calculer la valeur moyenne du taux de croissance spécifique ainsi que les estimations de la variance. Évaluer également le taux de croissance section par section, afin d'apprécier les effets du produit chimique d'essai durant la période d'exposition (par exemple en analysant les courbes de croissance log-transformées).

52. Le pourcentage d'inhibition du taux de croissance (I_t) peut ensuite être calculé pour chaque concentration expérimentale (groupe traité) selon la formule suivante:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

où:

% Ir: pourcentage d'inhibition du taux de croissance spécifique moyen

μC: valeur moyenne de μ dans le groupe témoin (*control*)

μT: valeur moyenne de μ dans le groupe traité

Rendement

53. Les effets sur le rendement sont déterminés en fonction de la variable de mesure correspondant à la longueur de la tige principale, à laquelle s'ajoutent trois autres variables (de préférence longueur totale des tiges, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles) pour les plantes de chaque récipient expérimental au début et à la fin de l'essai. Pour le poids sec comme pour le poids frais, la biomasse de départ est déterminée à partir d'un échantillon d'organisme d'essai issu du même lot que les plantes placées dans les récipients expérimentaux. Pour chaque concentration d'essai et chaque témoin, calculer un rendement moyen ainsi que les estimations de la variance. Le pourcentage moyen d'inhibition du rendement (% I_r) peut être calculé pour chaque groupe traité d'après la formule suivante:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

où:

% Iy: pourcentage de réduction du rendement

bC: biomasse finale moins biomasse de départ dans le groupe témoin (*control*)

bT: biomasse finale moins biomasse de départ dans le groupe traité

Temps de doublement

54. Pour déterminer le temps de doublement (T_d) de la longueur de la tige principale et ainsi vérifier que ce critère de validité est respecté (voir paragraphe 8), on applique la formule suivante avec les données obtenues dans les récipients témoins:

$T_d = \ln 2 / \mu$

où μ est le taux de croissance spécifique moyen calculé suivant les indications des paragraphes 50-52.

▼M7

Courbes concentration-effet

55. On trace des courbes concentration-effet décrivant le pourcentage d'inhibition moyen de la variable de réponse (I_t ou I_r, calculé comme indiqué aux paragraphes 53-54) en fonction du logarithme de la concentration du produit chimique d'essai.

Estimation de la CE_x

56. Les estimations de la CE_x doivent reposer à la fois sur le taux de croissance spécifique moyen (C_xE_t) et sur le rendement (C_xE_r), chacune de ces variables de réponse étant dérivée de la longueur de la tige principale, et, éventuellement, d'autres variables de mesure (idéalement longueur totale des tiges, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles). En effet, certains produits chimiques peuvent avoir des effets différents sur la longueur de la tige principale et sur d'autres variables de mesure. Les paramètres de toxicité souhaités sont donc quatre valeurs CE_x pour chaque niveau d'inhibition x calculé: C_xE_t (longueur de la tige principale); C_xE_t (idéalement longueur totale des tiges, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles); C_xE_r (longueur de la tige principale); et C_xE_r (idéalement longueur totale des tiges, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles).

57. Il convient de noter que les valeurs de la CE_x calculées à l'aide de ces deux variables de réponse ne sont pas comparables, et que cette différence est prise en compte lors de l'exploitation des résultats de l'essai. Les valeurs de la CE_x basées sur le taux de croissance spécifique moyen (C_xE_t) seront généralement supérieures à celles basées sur le rendement (C_xE_r) — si les conditions expérimentales de la présente méthode d'essai sont appliquées — en raison du fondement mathématique de chacune de ces approches. Cette différence n'est due qu'au calcul mathématique, il ne s'agit pas d'une différence de sensibilité entre les deux variables de réponse.

Méthodes statistiques

58. L'objectif consiste à obtenir une relation quantitative concentration-effet par une analyse de régression. Il est possible d'utiliser une régression linéaire pondérée après avoir effectué une transformation linéarisante des valeurs décrivant l'effet observé, à l'aide de modèles probit ou logit ou Weibull (7), par exemple, mais il est préférable d'appliquer des méthodes de régression non linéaire, celles-ci traitant mieux les inévitables irrégularités de valeurs et les écarts par rapport aux distributions régulières. Proches de zéro ou de l'inhibition totale, ces irrégularités risquent d'être amplifiées par la transformation et d'interférer avec l'analyse (7). Notons que les méthodes d'analyse courantes faisant appel aux transformations probit, logit ou Weibull sont prévues pour analyser des réponses de type tout ou rien (mortalité ou survie, par exemple) et doivent être modifiées pour pouvoir être utilisées avec les valeurs du taux de croissance ou du rendement. Les références (8) (9) (10) décrivent des procédures permettant de déterminer les valeurs de la CE_x à partir de données continues.

59. Pour chaque variable de réponse à analyser, utiliser la relation concentration-effet pour calculer des estimations ponctuelles des valeurs de CE_x. Déterminer, si possible, les limites de confiance à 95 % pour chaque estimation. La validité de l'ajustement des données décrivant les effets au modèle de régression est à évaluer par un procédé statistique ou graphique. L'analyse de régression doit s'appuyer sur les effets relevés dans chaque réplicat et non sur les moyennes par groupe traité.

60. Les estimations de la CE_{50} et les limites de confiance peuvent aussi être obtenues par interpolation linéaire avec bootstrap (rééchantillonnage) (10), si les modèles ou les méthodes de régression disponibles ne conviennent pas aux données.

61. Afin d'estimer la CMEO, et par conséquent la CSEO, il est nécessaire de comparer les moyennes des groupes traités par une analyse de variance (ANOVA). La moyenne pour chaque concentration est alors comparée à la moyenne des témoins en faisant appel à une méthode appropriée de comparaison multiple ou à des tests de tendance. Les tests de Dunnett ou de William peuvent être utiles (12) (13) (14) (15) (16). Il est nécessaire de vérifier si l'hypothèse d'homogénéité de la variance de l'ANOVA tient. On peut effectuer cette vérification graphiquement ou à l'aide d'un test formel

▼M7

(15). Les tests de Levene ou de Bartlett conviennent à cet effet. L'infirmation de l'hypothèse d'homogénéité de la variance peut quelquefois être corrigée par une transformation logarithmique des données. Si l'hétérogénéité de la variance est extrême et ne peut être rectifiée par une transformation, on envisagera des méthodes d'analyse telles que les tests de tendance régressifs de Jonkheere. La référence (10) livre des renseignements supplémentaires sur la détermination de la CSEO.

62. En raison des avancées scientifiques récentes, on préconise l'abandon de la notion de CSEO et son remplacement par des estimations ponctuelles de la CE_x. Pour cet essai sur Myriophylles, aucune valeur de x appropriée n'a été établie. Toutefois, un intervalle allant de 10 à 20 % semble convenir (selon la variable de réponse choisie), et il est préférable de mentionner à la fois la CE_{10} et la CE_{20}, ainsi que les limites de confiance associées.

Rapport

63. Le rapport d'essai mentionne les informations suivantes:

Produit chimique d'essai

Substance mono-constituant:

— apparence physique, hydrosolubilité, autres propriétés physico-chimiques;

— identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. (y compris la teneur en carbone organique, si cela se justifie).

Substance multi-constituants, UVCB ou mélange:

— caractérisée, autant que possible par p.ex. l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence quantitative et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants.

Espèce soumise à l'essai

— Nom scientifique et source.

Conditions de l'essai

— Mode opératoire suivi (statique ou semi-statique).

— Date du début de l'essai et durée de l'essai.

— Milieu expérimental.

— Description de la conception de l'essai (récipients d'essai et couvercles, volumes des solutions, longueur de la tige principale par récipient expérimental au début de l'essai).

— Concentrations d'essai (nominales et mesurées selon les besoins) et nombre de réplicats par concentration.

— Méthodes de préparation des solutions mères et des solutions d'essai, y compris utilisation éventuelle d'un solvant ou d'un dispersant.

— Température durant l'essai.

— Source, intensité et homogénéité lumineuses.

— Valeurs du pH des milieux traités et des milieux témoins.

— Méthode d'analyse du produit chimique d'essai, avec données appropriées sur l'évaluation de la qualité (études de validation, écarts-types ou limites de confiance des analyses).

▼M7

— Méthodes de détermination de la longueur de la tige principale et des autres variables de mesure, par exemple longueur totale des branches latérales, longueur totale des tiges, longueur totale des racines, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles.

— État de la culture (stérile ou non stérile) de chaque récipient traité ou témoin à chaque observation.

— Toute déviation par rapport à la présente méthode d'essai.

Résultats

— Données brutes: longueur de la tige principale et autres variables de mesure pour chaque récipient traité et témoin à chaque observation et à chaque analyse.

— Moyennes et écarts-types pour chaque variable de mesure.

— Courbes de croissance pour chaque variable de mesure.

— Calcul des variables de réponse pour chaque réplicat traité, avec valeurs moyennes et coefficient de variation des réplicats.

— Représentation graphique de la relation concentration-effet.

— Estimation des effets toxiques pour les variables de réponse, par exemple CE_{50}, CE_{10}, CE_{20} et intervalles de confiance associés. Si elles ont été calculées, la CMEO et/ou la CSEO ainsi que les méthodes statistiques utilisées pour les déterminer.

— Si l'on a effectué une analyse de variance, amplitude de l'effet détectable (par exemple, différence la moins significative).

— Toute stimulation de la croissance constatée, le cas échéant, dans un groupe traité.

— Tout signe visuel de phytotoxicité et observations des solutions d'essai.

— Discussion des résultats, notamment concernant une influence éventuelle sur les résultats de l'essai de modifications apportées à la présente méthode d'essai.

BIBLIOGRAPHIE

(1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.

(2) Maletzki, D. *et al*. (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch,* No. 22, pp. 702–710.

(3) Chapitre C.26 de la présente annexe*: Lemna sp. Essai d'inhibition de la croissance.*

(4) OCDE (2014), «*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system», Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 205, OCDE, Paris.

(5) OCDE (2000), «Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures», Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 23, OCDE, Paris.

(6) Chapitre C.51 de la présente annexe: Essai de toxicité sur *Myriophyllum spicatum* dans un système eau-sédiment

▼**M7**

(7) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.

(8) Nyholm, N. *et al*. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chem*istry, Vol. 11/2, pp. 157-167.

(9) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, pp. 1485-1494.

(10) OCDE (2006), «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application», Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 54, OCDE, Paris.

(11) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.

(12) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.

(14) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.

(15) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.

(16) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, pp. 93-96.

▼M7

Appendice 1

DÉFINITIONS

Biomasse: poids frais et/ou sec de la matière vivante présente dans une population. Dans cet essai, la biomasse comprend la tige principale, toutes les branches latérales et toutes les racines.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Chlorose: décoloration de l'organisme d'essai, en particulier des verticilles, passant du vert au jaune.

CE_x: concentration du produit chimique d'essai dissous dans le milieu expérimental qui entraîne une réduction de x % (par exemple 50 %) de la croissance de *Myriophyllum spicatum* pendant une période d'exposition définie (à mentionner explicitement si elle s'écarte de la durée normale ou totale de l'essai). Afin de distinguer les valeurs de la CE mesurées en fonction du taux de croissance de celles mesurées en fonction du rendement, on utilise les abréviations CE_t s'agissant du taux de croissance, et CE_r s'agissant du rendement, suivies par la mention de la variable de mesure utilisée, par exemple CE_r (longueur de la tige principale).

Croissance: augmentation de la variable de mesure, par exemple longueur de la tige principale, longueur totale des branches latérales, longueur totale des tiges, longueur totale des racines, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles, pendant la période d'essai.

Taux de croissance (taux de croissance spécifique moyen): accroissement logarithmique de la variable de mesure pendant la période d'exposition. *Note*: Les variables de réponse relatives au taux de croissance ne dépendent pas de la durée de l'essai tant que la croissance des organismes témoins non traités obéit à une loi exponentielle.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): concentration d'essai la plus faible à laquelle on observe que le produit chimique exerce un effet statistiquement significatif de réduction de la croissance (à $p < 0,05$) par comparaison avec le témoin, durant une période d'exposition donnée. Cependant, toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO devraient avoir un effet néfaste supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Si ces deux conditions ne sont pas réunies, il convient de justifier de façon détaillée le choix de la CMEO (et donc de la CSEO).

Variables de mesure: les variables de tout type qui sont mesurées pour exprimer le critère d'évaluation de l'effet au moyen d'une ou plusieurs variables de réponse. Dans la présente méthode d'essai, les variables de mesure sont la longueur de la tige principale, la longueur totale des branches latérales, la longueur totale des tiges, la longueur totale des racines, le poids frais, le poids sec et le nombre de verticilles.

Monoculture: culture monospécifique.

Nécrose: tissu mort (d'aspect blanc ou brun foncé) de l'organisme d'essai.

Concentration sans effet observé (CSEO): concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO.

Variable de réponse: variable permettant d'estimer la toxicité à partir de n'importe quelle variable mesurée décrivant la biomasse, selon différentes méthodes de calcul. Dans la présente méthode d'essai, le taux de croissance et le rendement représentent les variables de réponse dérivées des variables de mesure telles que la longueur de la tige principale, la longueur totale de tiges, le poids frais, le poids sec ou le nombre de verticilles.

Essai semi-statique: essai dans lequel la solution d'essai est renouvelée périodiquement à intervalles définis durant l'essai.

Essai statique: essai pendant lequel la solution d'essai n'est pas renouvelée.

▼M7

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Critère d'évaluation de l'effet: décrit le facteur général qui sera modifié, par rapport au témoin, par le produit chimique d'essai. Dans la présente méthode d'essai, le critère d'évaluation de l'effet est l'inhibition de la croissance, qui peut être exprimé par différentes variables de réponse dérivées d'une ou plusieurs variables de mesure.

Milieu d'essai: milieu de croissance synthétique complet dans lequel les plantes mises à l'épreuve se développent pendant qu'elles sont exposées au produit chimique d'essai. Normalement, le produit chimique d'essai est dissous dans le milieu expérimental.

UVCB: substance de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques

Rendement: valeur de la variable de mesure choisie pour exprimer la biomasse à la fin de la période d'exposition moins la valeur de cette variable au début de la période d'exposition. *Note*: Lorsque la croissance des organismes non exposés obéit à une loi exponentielle, les variables de réponse fondées sur le rendement diminuent quand la durée du test augmente.

▼M7

Appendice 2

MILIEU D'ANDREWS MODIFIE POUR LES PRÉCULTURES ET LES CULTURES MÈRES

Le milieu d'Andrews modifié nécessaire aux précultures et aux cultures mères est préparé à partir de cinq solutions mères nutritives élaborées séparément, auxquelles on ajoute 3 % de sucrose.

Tableau 1

Composition de la solution nutritive d'Andrews (Norme ASTM E 1913-04)

Production des solutions mères nutritives			Production de la solution nutritive
Solution mère	Produit chimique	Poids initial pour 1 000 ml	ml pour 5 l de solution nutritive
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO_3	8,08 g	
	$Ca(NO_3)_2$ * 4 H_2O	18,88 g	
2	$MgSO_4$ * 7 H_2O	9,86 g	50
3	Voir solution mère n° 3.1 ci-dessous		50
4	KH_2PO_4	2,72 g	50
5	$FeSO_4$ * 7 H_2O	0,278 g	50
	Na_2EDTA * 2 H_2O	0,372 g	

Les solutions mères peuvent être conservées au réfrigérateur pendant six mois (entre 5 et 10 °C). Seule la solution mère n° 5 a une durée de conservation inférieure (deux mois).

Tableau 2

Production de la solution mère n° 3.1 servant à préparer la solution mère n° 3

Produit chimique	Poids initial en g/100 ml
$MnSO_4$ * 4 H_2O	0,223
$ZnSO_4$ * 7 H_2O	0,115
H_3BO_3	0,155
$CuSO_4$ * 5 H_2O	0,0125
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ * 4 H_2O	0,0037

Après obtention de la solution mère n° 3.1 (Tableau 2), la répartir en aliquotes d'environ 11 ml qui seront congelées à une température inférieure ou égale à – 18 °C. Ces portions congelées se conservent cinq ans.

Pour préparer la solution mère n° 3, décongeler une solution mère n° 3.1, en verser 10 ml dans une fiole volumétrique de 1 l et ajouter de l'eau ultra pure jusqu'à la jauge.

Pour obtenir le milieu d'Andrews modifié, verser environ 2 500 ml d'eau ultra pure dans une fiole volumétrique de 5 l. Y ajouter 50 ml de chaque solution mère, remplir 90 % de la fiole volumétrique avec de l'eau ultra pure et amener le pH à 5,8.

▼M7

Ajouter ensuite 150 g de sucrose dissous (équivalant à 3 % dans 5 l), puis compléter jusqu'à la jauge avec de l'eau ultra pure. Enfin, verser la solution nutritive dans des fioles Schott de 1 l et autoclaver à 121 °C pendant 20 minutes.

La solution nutritive ainsi obtenue peut être conservée stérile au réfrigérateur (entre 5 et 10 °C) pendant trois mois.

Milieu d'Andrews modifié pour l'essai de toxicité dans un système sans sédiment

Le milieu d'Andrews modifié concentré dix fois qui entre dans la composition des solutions d'essai est préparé à partir des cinq solutions mères nutritives déjà mentionnées dans les tableaux 1 et 2, après ajout de sucrose à hauteur de 30 %. Pour ce faire, verser environ 100 ml d'eau ultra pure dans une fiole volumétrique de 1 l. Ajouter 100 ml de chacune des solutions mères puis amener le pH à 5,8. Ensuite, dissoudre du sucrose pour une concentration de 30 % (soit 300 g dans 1 000 ml), puis compléter avec de l'eau ultra pure jusqu'à la jauge.

Enfin, verser la solution nutritive dans des fioles Schott de 0,5 l et autoclaver à 121 °C pendant 20 minutes.

La solution nutritive concentrée dix fois ainsi obtenue peut être conservée stérile au réfrigérateur (entre 5 et 10 °C) pendant trois mois.

▼M7

Appendice 3

ENTRETIEN D'UNE CULTURE MÈRE

Le présent appendice 3 décrit la culture mère de *Myriophyllum spicatum* L ([1]), espèce de plante aquatique immergée dicotylédone de la famille des myriophylles. Entre juin et août, elle produit de discrètes fleurs roses et blanches qui pointent à la surface de l'eau. Les plantes sont enracinées dans le sol grâce à un système de rhizomes robustes. Elles poussent dans tout l'hémisphère nord dans des eaux stagnantes eutrophiques mais non polluées et plutôt calcifères qui contiennent un substrat boueux. *Myriophyllum spicatum* s'épanouit mieux en eau douce, mais se trouve aussi en eau saumâtre.

La culture mère dans un système sans sédiment en conditions de laboratoire fait appel à des plantes stériles. On peut obtenir des plantes stériles auprès du laboratoire d'écotoxicologie de l'Umweltbundesamt allemand (Agence fédérale allemande pour l'environnement).

Il est aussi possible d'obtenir des organismes d'essai à partir de végétaux non stériles, conformément à la norme ASTM E 1913-04. La méthode de culture de spécimens de *Myriophyllum sibiricum* prélevés dans la nature indiquée ci-dessous est tirée du guide ASTM:

> «Si l'on opte pour des plantes non stériles prélevées dans la nature, récolter des turions de *M. sibiricum* à l'automne. Placer ces turions dans un aquarium de 20 l contenant 5 cm de sédiment stérile recouvert de sable siliceux ou, par exemple, de Turface® et de 18 l d'eau de qualité réactif. Aérer l'aquarium, maintenir sa température à 15 °C ainsi que l'intensité lumineuse entre 200 et 300 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ pendant 16 heures par jour. La culture des plantes en aquarium peut fournir des végétaux de remplacement si les cultures stériles sont détruites par un dysfonctionnement mécanique dans l'enceinte de croissance, par une contamination ou d'autres causes encore. Les spécimens cultivés dans l'aquarium ne sont pas stériles, et les cultures stériles ne peuvent être conservées dans un système de culture en discontinu. Pour stériliser la culture, les plantes sont retirées de l'aquarium et rincées pendant une demi-heure environ dans un courant d'eau désionisée. Elles sont ensuite désinfectées en conditions aseptiques dans une hotte à flux laminaire pendant moins de 20 min (jusqu'à ce que la majorité des tissus végétaux aient blanchi et que seul l'apex en croissance reste vert) dans une solution d'hypochlorite de sodium à 3 % (m/v) contenant 0,01 % d'un tensioactif adapté. Agiter le désinfectant et le matériel végétal. Les segments comptant plusieurs nœuds sont transférés dans des tubes de culture stériles contenant 45 ml de milieu d'Andrews modifié stérilisé, ensuite clos avec leurs bouchons ordinaires. On ne place qu'un segment végétal par enceinte expérimentale. Pour s'assurer que les récipients de culture sont bien fermés, on les scelle avec du film de laboratoire. Une fois qu'une culture stérile a été préparée, il convient de transférer les segments végétaux comptant plusieurs nœuds dans de nouvelles enceintes expérimentales contenant du milieu nutritif liquide nouvellement préparé tous les dix à douze jours. Des cultures sur boîtes de gélose ont montré que les plantes doivent être stériles et le demeurer pendant huit semaines avant le lancement de l'essai.»

Comme le milieu d'Andrews modifié contient du sucrose (qui stimule la croissance des champignons et des bactéries), l'ensemble du matériel, des solutions et des cultures seront manipulés en conditions stériles. Il convient de stériliser tous les liquides et le matériel expérimental avant de les utiliser. Cette stérilisation est effectuée par traitement à l'air chaud (210 °C) pendant 4 heures, ou en autoclave durant 20 minutes à 121 °C. D'autre part, tous les ballons, fioles, boîtes et autres équipements sont passés à la flamme sur une paillasse stérile avant d'être utilisés.

Les cultures mères peuvent être conservées plus longtemps sous un éclairage et à une température réduits (50 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$, 20 ± 2 °C) sans qu'il faille les préparer à

([1]) Carl von Linné (né le 23 mai 1707 à Råshult/Älmhult, décédé le 10 janvier 1778 à Uppsala).

▼M7

nouveau. Le milieu de croissance des myriophylles doit être à le même que celui utilisé pour l'essai, mais d'autres milieux riches en éléments nutritifs peuvent être utilisés pour les cultures mères.

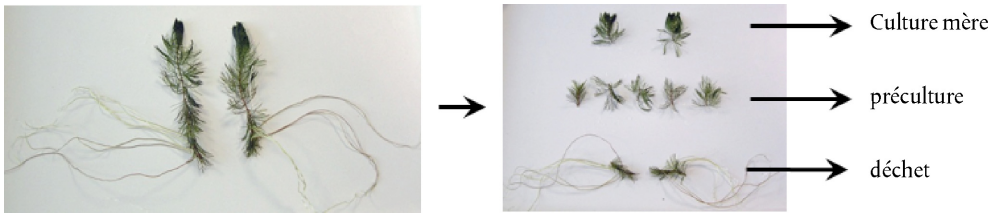
Les segments végétaux axéniques sont répartis dans plusieurs erlenmeyers de 500 ml et/ou dans des fioles Fernbach de 2 000 ml, chaque récipient contenant environ 450 ml (erlenmeyers) ou 1 000 ml (fioles Fernbach) de milieu d'Andrews modifié. Les récipients sont alors scellés avec des bouchons en cellulose pour garantir l'axénisation.

D'autre part, il est impératif de minutieusement passer à la flamme l'équipement de la paillasse stérile juste avant de l'utiliser. En fonction de leur nombre et de leur taille, les plantes sont transférées dans une nouvelle solution nutritive toutes les trois semaines environ.

Pour cette culture renouvelée, on peut utiliser les apex ou des segments de la partie médiane de la tige. Le nombre et la taille des plantes (ou segments de plante) transférées dépendent du nombre de plantes nécessaire. Par exemple, il est possible de transférer cinq segments de tige dans une fiole Fernbach et trois segments de tige dans un erlenmeyer, chaque segment ayant une longueur de 5 cm. Éliminer tout segment présentant des racines, des fleurs, des parties mortes ou qui se distinguent d'une manière ou d'une autre.

Figure 1

Sectionnement des plantes pour la culture mère et la préculture après 3 semaines de culture.



Les plantes sont cultivées dans des erlenmeyers de 500 ml et des fioles Fernbach de 2 000 ml dans un incubateur réfrigérant à 20 ± 2 °C avec un éclairage continu dont l'intensité est approximativement comprise entre 100 et 150 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ ou 6 000-9 000 lux (émis par l'éclairage de l'enceinte avec une température de couleur correspondant à une «lumière blanche chaude»).

Figure 2

Culture des plantes dans un incubateur réfrigérant éclairé.



Il convient d'utiliser des récipients de culture en verre stériles et chimiquement propres (lavés à l'acide) et d'employer des techniques de manipulation aseptiques. En cas de contamination de la culture mère, notamment par des algues, des champignons et/ou des bactéries, il convient de préparer une nouvelle culture ou d'utiliser une culture mère provenant d'un autre laboratoire pour la remplacer.

▼M7

Appendice 4

ENTRETIEN D'UNE PRÉCULTURE ET PRÉPARATION DE L'ORGANISME POUR L'ESSAI

Pour obtenir une préculture, couper les tiges de la culture mère en segments comptant deux verticilles chacun. Placer ces segments dans des fioles Fernbach remplies de milieu d'Andrews modifié contenant 3 % de sucrose. Chaque fiole peut recevoir jusqu'à 50 segments de tige. Cependant, on s'assurera que les segments sont vivants et ne présentent ni racines, ni branches latérales, ni bourgeons (voir graphique 1 de l'appendice 3).

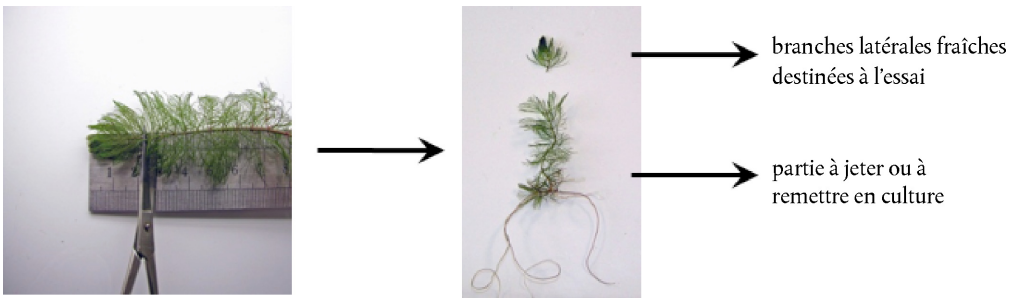
La préculture dure 14 à 21 jours en conditions stériles dans une enceinte environnementale alternant 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. L'intensité lumineuse sera comprise entre 100 et 150 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$. La température des récipients d'essai est maintenue à 23 ± 2 °C.

Étant donné que le milieu d'Andrews modifié contient du sucrose (qui stimule la croissance des algues, des champignons et des bactéries), les solutions du produit chimique d'essai sont préparées et la culture est effectuée en conditions stériles. L'ensemble des liquides et du matériel expérimental est stérilisé avant utilisation. Cette stérilisation se fait par traitement à l'air chaud (210 °C) pendant 4 heures, ou en autoclave durant 20 minutes à 121 °C. D'autre part, tous les ballons, fioles, boîtes et autres équipements sont passés à la flamme sur une paillasse stérile avant d'être utilisés.

On retire les tiges des fioles de préculture en conditions axéniques, en choisissant un matériel végétal aussi homogène que possible. Chaque essai nécessite au moins 60 spécimens (essai portant sur huit concentrations du produit chimique d'essai). Aux fins de l'essai, prélever des branches latérales des végétaux précultivés, les raccourcir à 2,5 cm à partir de leur base (mesure effectuée à l'aide d'une règle) et les transférer dans un bécher contenant du milieu d'Andrews modifié stérile. Ces branches latérales fraîches peuvent servir à l'essai de toxicité sur *Myriophyllum spicatum* dans un système sans sédiment.

Figure 2

Sectionnement des plantes précultivées pour l'essai de toxicité sur *Myriophyllum spicatum* dans un système sans sédiment.



▼M7

C.51. ESSAI DE TOXICITÉ SUR *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* DANS UN SYSTÈME EAU-SÉDIMENT

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 239 (2014) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Il existe des méthodes d'essai pour les essais portant sur des plantes aquatiques monocotylédones flottantes appartenant au genre *Lemna* (1) et pour des espèces d'algues (2). Ces méthodes sont utilisées en routine pour produire des données permettant d'évaluer les risques liés à des produits chimiques d'essai, en particulier des herbicides, pour des espèces végétales aquatiques non-cibles. Il est néanmoins parfois nécessaire d'obtenir des données pour d'autres espèces de macrophytes. Selon un document d'orientation récemment publié à l'issue d'un atelier de la Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) sur l'évaluation des risques liés aux pesticides pour les macrophytes aquatiques (*Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides*, AMRAP), il est parfois nécessaire de disposer de données concernant les effets sur une espèce de macrophyte enracinée d'un produit chimique d'essai dont on sait que le mode d'action n'affecte pas les espèces *Lemna* et les algues, ou dont la répartition dans le sédiment laisse craindre une exposition par les racines (3). D'après les connaissances actuelles et l'expérience acquise à ce jour, ce sont les végétaux appartenant au genre des Myriophylles qui ont été choisis comme espèce privilégiée lorsque des données supplémentaires sur une espèce dicotylédone immergée et enracinée sont requises (4) (5) (6). Cet essai ne remplace pas les autres essais de toxicité aquatique, mais doit les compléter de manière à permettre une évaluation plus complète des dangers et des risques pour la flore aquatique. La méthode d'essai sur *Myriophyllum spicatum* dans un système eau-sédiment complète l'essai de toxicité sur *Myriophyllum spicatum* dans un système sans sédiment (7).

2. Le présent document décrit une méthode d'essai qui permet d'évaluer l'effet d'un produit chimique d'essai sur une plante aquatique enracinée, *Myriophyllum spicatum*, dans un système eau-sédiment. Cette méthode d'essai s'inspire partiellement des méthodes existantes (1) (2) (8) et tient compte de recherches récentes sur l'évaluation des risques pour les plantes aquatiques (3). La méthode avec un système eau-sédiment a été validée par un essai circulaire international mené sur des myriophylles cultivés en conditions statiques et exposés au produit chimique d'essai via la colonne d'eau (9). Ce système expérimental est toutefois facile à adapter pour exposer les plantes par le biais d'un sédiment chargé ou de la phase aqueuse dans des scénarios semi-statiques ou à dose pulsée, bien que ces modes opératoires n'aient pas été formellement étudiés dans l'essai circulaire. Par ailleurs, la méthode générale peut convenir pour d'autres espèces enracinées immergées ou émergées, notamment d'autres espèces de Myriophylles (dont *Myriophyllum aquaticum*) ou *Glyceria maxima* (10). Pour ces autres taxons, il faudra éventuellement modifier les conditions, la conception et la durée de l'essai. Plus spécifiquement, des travaux complémentaires sont nécessaires pour définir les procédures appropriées concernant *Myriophyllum aquaticum*. Ces options ne sont pas présentées en détail dans la présente méthode d'essai, qui décrit l'approche standard de l'exposition de *Myriophyllum spicatum* via la phase aqueuse dans un système statique.

3. La présente méthode d'essai s'applique aux substances, pour lesquelles elle a été validée [comme l'indique le rapport de l'essai circulaire (9)], soit aux préparations ou mélanges connus. Un essai sur myriophylles peut servir à répondre à un besoin de données de niveau 1 motivé par une éventuelle contamination du sédiment par une partie du produit chimique d'essai, ou par des questions relatives au mode d'action ou à la sélectivité. De même, un essai sur myriophylles en laboratoire peut être requis dans le cadre d'une stratégie de niveau supérieur répondant à des préoccupations quant aux risques pour les plantes aquatiques. C'est la motivation particulière de l'essai qui déterminera la voie d'exposition (via l'eau ou via le sédiment). Avant d'utiliser la méthode d'essai sur un mélange pour générer des données dans une perspective réglementaire, on examinera si, et si oui, pourquoi, elle peut fournir des résultats adéquats à cette fin. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé.

▼M7

PRINCIPE DE L'ESSAI

4. L'essai est conçu pour évaluer les effets de produits chimiques sur le développement végétatif de plantes appartenant au genre des Myriophylles cultivées dans des milieux standardisés (eau, sédiment et nutriments). À cette fin, on plante des apex d'individus sains et sans fleurs dans un sédiment synthétique standard supplémenté avec des nutriments permettant leur croissance adéquate, puis on les maintient dans le milieu de Smart et Barko (appendice 1). Après une période d'implantation permettant aux racines de se former, les végétaux sont exposés à une série de concentrations d'essai ajoutées à la colonne d'eau. Il est aussi possible de simuler une exposition via le sédiment en chargeant le sédiment artificiel avec le produit chimique d'essai avant d'y transplanter les végétaux. Dans les deux cas, les plantes sont ensuite cultivées dans des conditions environnementales contrôlées pendant 14 jours. Les effets sur la croissance sont déduits d'évaluations quantitatives de la longueur de la tige, du poids frais et du poids sec, ainsi que d'observations qualitatives de symptômes tels que la chlorose, la nécrose ou les anomalies de croissance.

5. Pour quantifier les effets imputables au produit chimique, la croissance observée dans les solutions d'essai est comparée à celle des plantes témoins, et la concentration induisant un pourcentage donné d'inhibition de la croissance est déterminée et exprimée en termes de CE_x, où «x» peut correspondre à n'importe quelle valeur exigée par la réglementation, par exemple CE_{10}, CE_{20} et CE_{50}. Notons que les estimations de la CE_{10} et de la CE_{20} ne sont fiables et appropriées que dans les essais où les coefficients de variation établis pour les plantes témoins sont inférieurs au niveau d'effet recherché; pour la CE_{20}, cela signifie que ces coefficients de variation doivent rester sous la barre des 20 %.

6. On détermine le taux de croissance spécifique moyen (estimé à partir de la longueur de la tige, du poids frais et du poids sec de la tige) ainsi que le rendement (estimé à partir de l'accroissement de la tige, du poids frais et du poids sec de la tige) chez les plantes témoins et les plantes traitées. Le taux de croissance spécifique (t) et le rendement (r) sont ensuite utilisés pour déterminer la C_xE_t (par exemple $C_{10}E_t$, $C_{20}E_t$, $C_{50}E_t$) et la C_xE_r (par exemple, $C_{10}E_r$, $C_{20}E_r$, $C_{50}E_r$).

7. S'il y a lieu, la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et la concentration sans effet observé (CSEO) peuvent être déterminées par un calcul statistique en s'appuyant sur les estimations du rendement et des taux de croissance spécifiques moyens.

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE D'ESSAI

8. Il conviendrait de disposer d'une méthode analytique suffisamment sensible pour quantifier le produit chimique d'essai dans le milieu expérimental.

9. Parmi les données sur le/les produit(s) chimique(s) d'essai qui pourraient servir à établir les conditions expérimentales figurent la formule structurale, la composition (dans le cas de substances multiconstituants, d'UVCB, de mélanges ou de préparations), la pureté, l'hydrosolubilité, la stabilité dans l'eau et à la lumière, la constante d'acidité (pK_a), le coefficient de partage octanol-eau (K_{oe}), si possible le K_d dans les sédiments, la pression de vapeur et la biodégradabilité. L'hydrosolubilité et la pression de vapeur peuvent être utilisées pour calculer la constante de Henry, qui indiquera si des pertes appréciables de produit chimique d'essai risquent de se produire durant l'essai. Si l'on peut s'attendre à des pertes de produit chimique d'essai, celles-ci doivent être quantifiées et les mesures prises pour y remédier doivent être documentées. Si la solubilité et la stabilité du/des produit(s) chimique(s) d'essai ne sont pas connues avec certitude, il est recommandé de les évaluer dans les conditions de l'essai, c'est-à-dire dans le milieu de croissance ainsi qu'à la température et sous le régime d'éclairage appliqués durant l'essai. *Note*: Quand l'essai porte sur des herbicides qui ont une action peroxydante photo-induite, l'éclairage du laboratoire sera réglé de façon à émettre le même rayonnement ultraviolet que la lumière naturelle du soleil.

▼M7

10. Le pH du milieu d'essai est mesuré et ajusté, s'il y a lieu. Il est particulièrement important de maîtriser le pH du milieu expérimental, notamment pour tester des métaux ou des produits chimiques sensibles à l'hydrolyse. Pour les essais rendus difficiles par les propriétés physico-chimiques du produit chimique d'essai, on trouvera des informations supplémentaires dans un document d'orientation de l'OCDE (11).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

11. Pour garantir la validité des résultats de l'essai, il faut que les moyennes de la longueur totale des tiges et du poids frais des tiges obtenues pour les plantes témoins aient au moins doublé au cours de la phase d'exposition de l'essai. Par ailleurs, les plantes témoins ne doivent pas présenter de symptômes apparents de chlorose, ni de signes manifestes de contamination par d'autres organismes comme des algues et/ou des films de bactéries, que ce soit sur le végétal, à la surface du sédiment ou dans le milieu expérimental.

12. Dans les cultures témoins, le coefficient de variation moyen du rendement basé sur la mesure du poids frais des tiges (entre le début et la fin de l'essai) ne doit pas dépasser 35 % entre les réplicats.

PRODUIT CHIMIQUE DE RÉFÉRENCE

13. Un ou plusieurs produits chimiques de référence, comme le 3,5-dichlorophénol utilisé dans l'essai circulaire (9), doivent faire l'objet d'essais réguliers pour vérifier la validité de la procédure d'essai au fil du temps. Dans l'essai circulaire, les valeurs moyennes de la CE_{50} du 3,5-DCP pour les différentes variables de réponse étaient comprises entre 4,7 et 6,1 mg/l (voir le rapport de l'essai circulaire pour plus de précisions sur les intervalles de confiance anticipés associés à ces valeurs). Il est conseillé de tester le produit chimique de référence au moins deux fois par an ou, si l'essai est rarement conduit, parallèlement aux essais de définitifs de toxicité. Le rapport statistique de l'essai circulaire international (9) comprend un guide indiquant les valeurs de la CE_{50} attendues pour le 3,5-DCP.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

14. L'essai est mené dans des conditions environnementales contrôlées, c'est-à-dire dans une enceinte de croissance, une salle de croissance ou un laboratoire où il est possible de maîtriser la longueur du jour, l'éclairage et la température (voir les paragraphes 56-58 de la section «Conditions expérimentales»). Les cultures mères doivent être conservées séparément des récipients d'essai.

15. Il convient de réaliser l'étude en utilisant des récipients expérimentaux en verre, par exemple des aquariums ou des béchers; on utilise communément des béchers en verre de 2 l (environ 24 cm de hauteur et 11 cm de diamètre). D'autres récipients (plus grands) pourraient néanmoins convenir, à condition que la hauteur d'eau permette une croissance illimitée et que les plantes restent immergées pendant toute la durée de l'essai.

16. Des pots de fleurs en plastique ou en verre (environ 9 cm de diamètre et 8 cm de hauteur, pour un volume de 500 ml) peuvent être utilisés pour planter les végétaux dans le sédiment. Des béchers en verre peuvent aussi remplir cet office, et sont même préférables dans certains cas, notamment pour tester des produits chimiques hydrophobes ou à K_{oe} élevé.

17. La taille des béchers ou des pots sera fonction des récipients d'essai et du dispositif expérimental choisis (voir ci-dessous). Pour le dispositif expérimental A (une tige par pot, trois pots par récipient), il faudra peut-être des pots plus petits ou des récipients plus grands. Pour le dispositif expérimental B (trois tiges par pot, un pot par récipient), la taille indiquée pour les pots et les récipients devrait convenir. Dans tous les cas, il faut que le sédiment soit recouvert d'au moins 12 cm d'eau, et on notera le rapport entre superficie/volume de sédiment et superficie/volume d'eau.

▼M7

Organisme d'essai

18. Le principe général de cette méthode d'essai peut être appliqué à différentes espèces de plantes aquatiques. Cependant, les conditions définies dans la présente méthode d'essai ont été établies pour une espèce précise de Myriophylles, *Myriophyllum spicatum*. Cette espèce appartient à une famille de plantes dicotylédones, les Haloragidacées.

19. *Myriophyllum spicatum* (Myriophylle en épis) est une espèce immergée enracinée qui tolère des conditions très diverses et pousse dans des masses d'eau courantes ou stagnantes. C'est une plante vivace dont la partie non enracinée meurt pendant l'hiver. En général, ces végétaux fleurissent et produisent des graines librement, même si la propagation végétative à partir de bourgeons axillaires ou de fragments de tige, qui se détachent naturellement ou après une perturbation, est souvent la principale méthode de colonisation.

Culture de l'organisme d'essai

20. Le matériel végétal utilisé peut provenir de populations naturelles ou de fournisseurs de plantes aquatiques. Dans les deux cas, il convient de garder une trace de la source des plantes et d'en vérifier l'espèce. Lors des prélèvements de *Myriophyllum spicatum* dans la nature, il faut très minutieusement veiller à collecter l'espèce voulue, en particulier dans les régions où ce taxon peut former des hybrides avec d'autres Myriophylles. En cas de doute, il est conseillé de faire appel à des plantes cultivées en laboratoire dont l'espèce a été vérifiée et dont les sources sont connues. Il convient de ne pas utiliser les spécimens exposés à des contaminants chimiques ou prélevés sur des sites que l'on sait contaminés.

21. Dans les régions où *M. spicatum* n'est pas aisément disponible pendant les mois d'hiver, il peut s'avérer nécessaire d'entretenir durablement des cultures mères dans une serre ou en laboratoire. Les cultures mères sont entretenues dans des conditions similaires à celles de l'essai, mais l'énergie lumineuse et la température peuvent être réduites pour limiter la fréquence des opérations d'entretien (par exemple quand aucun essai sur myriophylles n'est prévu pendant un certain temps). Il est recommandé d'utiliser des pots de fleurs ou des aquariums plus grands que ceux qui sont employés dans les essais afin de laisser aux végétaux assez de place pour proliférer. La composition du sédiment et des milieux aqueux doit être identique à celle de l'essai, bien qu'il soit possible d'adopter d'autres méthodes de fertilisation du sédiment (en ayant par exemple recours à des préparations commerciales d'engrais à diffusion lente).

22. Les cultures mères ne doivent présenter aucune contamination visible par d'autres organismes comme des escargots, des algues filamenteuses, des champignons ou des insectes, notamment des œufs ou des larves du papillon *Paraponyx stratiotata* ainsi que des larves ou des adultes du curculionidé *Eubrychius velutus*. Pour éliminer les contaminations visibles, il faudra parfois rincer les végétaux à l'eau douce. En outre, on s'efforcera de réduire au minimum le développement d'algues unicellulaires et la contamination bactérienne, même s'il n'est pas nécessaire que les plantes soient parfaitement stériles. Les cultures mères sont surveillées et, s'il y a lieu, transplantées pour éviter la progression de contaminations par des algues ou des bactéries. Si ces contaminations deviennent problématiques, une aération des cultures mères peut s'avérer utile.

23. Dans tous les cas, les plantes sont cultivées ou acclimatées dans des conditions similaires — mais pas nécessairement identiques — aux conditions expérimentales pendant une période suffisante (supérieure à deux semaines) avant leur utilisation dans l'essai.

24. Les cultures mères qui fleurissent ne sont pas utilisées pour l'essai car les taux de croissance végétative sont généralement plus faibles pendant et après la floraison.

▼M7

Sédiment

25. Il est recommandé d'utiliser pour cet essai un sédiment reconstitué préparé selon la méthode décrite au chapitre C.28 de la présente annexe (8). À part l'ajout d'éléments nutritifs, la méthode de préparation est la même que celle décrite dans la méthode d'essai C.28:

a) 4-5 % de tourbe (poids sec, pour 2 ± 0,5 % de carbone organique) avec un pH aussi proche que possible de 5,5-6,0; il est important d'utiliser une tourbe sous forme de poudre, finement broyée (taille des particules de préférence inférieure à 1 mm) et séchée uniquement à l'air.

b) 20 % (poids sec) d'argile kaolinique (teneur en kaolinite de préférence supérieure à 30 %).

c) 75-76 % (poids sec) de sable quartzique (composé en majorité de sable fin, plus de 50 % des particules mesurant entre 50 et 200 μm).

d) ajouter un milieu nutritif aqueux de façon que le lot final de sédiment contienne 200 mg de chlorure d'ammonium et de phosphate de sodium par kilogramme de sédiment sec, avec un taux d'humidité compris entre 30 et 50 %.

e) ajouter du carbonate de calcium de qualité chimiquement pure ($CaCO_3$) pour ajuster le pH du mélange final de le sédiment à 7,0 ± 0,5.

26. La source de tourbe, d'argile kaolinique et de sable doit être connue et documentée. Si l'origine est inconnue ou suscite quelque préoccupation, il faut vérifier que chaque composant est exempt de contamination chimique (métaux lourds, composés organochlorés ou organophosphorés, etc.).

27. Il convient de mélanger les ingrédients secs du sédiment de manière homogène avant d'y incorporer uniformément la solution aqueuse de nutriments. Le sédiment humide est préparé au moins deux jours à l'avance pour que la tourbe soit complètement imbibée, et pour empêcher que des particules de tourbe hydrophobes ne surnagent une fois que le sédiment est recouvert par le milieu; avant utilisation, le sédiment humide peut être conservé dans l'obscurité.

28. Pour l'essai, le sédiment est transféré dans des récipients de taille adaptée, par exemple des pots de fleurs pouvant être contenus dans les récipients en verre (la superficie du sédiment doit recouvrir environ 70 % minimum de la superficie du récipient). Lorsque le récipient est troué au fond, on peut y placer un morceau de papier filtre pour empêcher le sédiment de s'échapper du récipient. Le sédiment est versé dans les pots de façon à obtenir une surface plane, puis on le recouvre d'une fine couche (2 à 3 mm environ) d'un matériau inerte tel que du sable, du gravier de jardin fin ou du corail broyé pour le maintenir en place.

Milieu d'essai

29. Il est conseillé d'employer le milieu de Smart et Barko (12) pour cultiver *Myriophyllum spicatum* et pour les essais. La préparation de ce milieu est décrite à l'appendice 1. Au début de l'essai, le pH du milieu (phase aqueuse) doit être compris entre 7,5 et 8,0 pour garantir une croissance végétale optimale.

Conception de l'essai

30. L'essai doit inclure au moins six récipients d'essai identiques (réplicats) du témoin non traité et au moins quatre réplicats pour chacune des concentrations d'exposition, lesquelles sont au nombre de cinq minimum.

31. Si la détermination de la CSEO n'est pas requise, le dispositif expérimental peut être modifié en augmentant le nombre de concentrations et en réduisant le nombre de réplicats par concentration.

▼M7

32. Chaque récipient d'essai représente un réplicat contenant trois pousses. Il existe deux possibilités pour cultiver trois pousses par récipient d'essai:

— Dispositif expérimental A: une pousse par pot et trois pots par récipient.

— Dispositif expérimental B: trois pousses par pot et un pot par récipient.

— D'autres dispositifs prévoyant une pousse par pot et par récipient d'essai sont acceptables, à condition d'ajuster le nombre de réplicats de manière à respecter les critères de validité.

33. Chaque récipient d'essai doit être assigné à un groupe traité de façon aléatoire. L'emplacement des récipients d'essai sur la surface réservée à l'essai doit être aléatoire, afin de réduire au minimum l'influence des différences spatiales d'intensité lumineuse ou de température.

Concentrations du produit chimique d'essai et groupes témoins

34. Les concentrations forment habituellement une série géométrique, et ne sont pas séparées par un facteur supérieur à 3,2. Un essai de détermination de l'ordre de grandeur donnera une première idée de la toxicité du produit chimique d'essai et permettra de sélectionner les concentrations d'essai adéquates.

35. Pour déterminer une CE_x, il faut que les concentrations d'essai encadrent la valeur de la CE_x afin que le niveau de confiance soit suffisant. Par exemple, s'il s'agit d'estimer la CE_{50}, la concentration d'essai la plus élevée doit dépasser la valeur de la CE_{50}. Si la CE_{50} se situe en dehors de la plage des concentrations, les intervalles de confiance seront importants et il risque d'être impossible d'évaluer correctement la validité de l'ajustement statistique du modèle. Recourir à un plus grand nombre de concentrations d'essai améliorera l'intervalle de confiance encadrant la CE_x obtenue.

36. Pour déterminer la CMEO et la CSEO (critère facultatif d'évaluation de l'effet), il faut que la concentration d'essai la plus faible soit suffisamment faible pour que la croissance des plantes exposées ne soit pas sensiblement différente de celle des témoins. De plus, la concentration expérimentale la plus élevée doit être suffisamment élevée pour que la croissance des plantes exposées soit significativement inférieure à celle des témoins. L'augmentation du nombre de réplicats accroît la puissance statistique du modèle analyse de variance/concentration sans effet.

Essai limite

37. Lorsqu'un essai de détermination de l'ordre de grandeur indique que le produit chimique d'essai n'entraîne aucun effet toxique à des concentrations allant jusqu'à 100 mg/l ou jusqu'à une concentration égale à sa limite de solubilité dans le milieu d'essai ou, dans le cas d'une préparation, à sa limite de dispersion, on peut conduire un essai limite afin de comparer les effets observés sur un groupe témoin et sur un groupe traité (à 100 mg/l ou à une concentration égale à la limite de solubilité, ou à 1 000 mg/kg de sédiment sec). Cet essai doit suivre les principes généraux d'un essai dose-effet classique, à ceci près qu'il est conseillé d'augmenter le nombre minimal de réplicats à six récipients expérimentaux par témoin et par concentration. La croissance des plantes dans le groupe témoin et le groupe traité peut être analysée au moyen d'un test statistique permettant de comparer les moyennes, par exemple un test t de Student.

Solutions d'essai

38. Les solutions d'essai sont habituellement préparées par dilution d'une solution mère, elle-même obtenue par dissolution ou par dispersion du produit chimique d'essai dans le milieu de Smart et Barko avec de l'eau déminéralisée (distillée ou désionisée) (voir l'appendice 1).

▼M7

39. Normalement, la concentration d'essai maximale ne peut dépasser l'hydrosolubilité du produit chimique d'essai ou, dans le cas des préparations, sa dispersibilité dans les conditions expérimentales.

40. Pour les produits chimiques peu solubles dans l'eau, il est parfois nécessaire de préparer une solution mère concentrée ou une dispersion du produit chimique à l'aide d'un solvant organique ou d'un dispersant afin de faciliter l'ajout de quantités précises du produit chimique d'essai dans le milieu ainsi que sa dispersion et sa dissolution. Le recours à ces auxiliaires doit être évité dans la mesure du possible. Les solvants ou les dispersants auxiliaires ne doivent pas induire de phytotoxicité. L'acétone et le diméthylformamide sont des exemples de solvants courants qui n'engendrent aucune phytotoxicité à des concentrations allant jusqu'à 100 µl/l. Si l'on utilise un solvant ou un dispersant, sa concentration finale doit être limitée et ne peut pas dépasser 100 µl/l. Elle doit alors être identique dans tous les récipients traités et témoins (du solvant) et spécifiée dans le rapport. L'essai doit aussi inclure des réplicats de témoins non traités qui ne contiennent ni solvant, ni dispersant. On trouvera des indications supplémentaires sur le recours aux dispersants dans un document d'orientation de l'OCDE (11).

MODE OPÉRATOIRE

41. Le mode opératoire varie en fonction de la voie d'application du produit chimique d'essai (phase aqueuse ou sédimentaire). Le comportement probable du produit chimique d'essai dans un système eau-sédiment doit être pris en compte dans le choix du régime d'exposition utilisé dans l'essai (statique ou à renouvellement statique, eau chargée ou sédiment chargé). Les essais avec sédiment chargé sont parfois préférables, notamment quand on s'attend à ce qu'une partie non négligeable du produit chimique passe dans la phase sédimentaire.

Phase d'implantation

42. Couper des apex ou extrémités de pousses sains, c'est-à-dire sans pousses latérales, sur les plantes des cultures mères, pour obtenir des segments de 6 cm (± 1 cm). Pour le dispositif expérimental A (une pousse par pot et trois pots par récipient), placer une seule extrémité pousse tige par pot. Pour le dispositif expérimental B (trois pousses par pot et un pot par récipient), placer quatre à cinq apex par pot contenant du sédiment.

43. Dans les deux cas, inclure des plantes dans des pots supplémentaires pour pouvoir choisir une série de spécimens homogènes au début de l'essai, ainsi que pour disposer de plantes surnuméraires qui serviront à contrôler la croissance des racines immédiatement avant le traitement ou seront récoltées pour mesurer la biomasse et la longueur de la pousse au Jour 0.

44. Les pousses sont introduites dans le sédiment de façon à que trois centimètres environ de pousse, comportant deux nœud, se trouve en dessous la surface.

45. Les pots sont ensuite transférés dans les récipients d'essai dans les mêmes conditions environnementales que pour la phase d'exposition, et sont maintenus sept jours dans le milieu de Smart et Barko afin de stimuler le développement racinaire.

46. Après cette étape, plusieurs plantes des pots surnuméraires sont retirées pour contrôler la croissance des racines. Si celle-ci n'est pas manifeste (pas d'extrémité de racine visible), il convient de prolonger la phase d'implantation jusqu'à ce qu'on constate un développement racinaire. Cette étape est recommandée pour garantir que les plantes sont en phase de croissance active au commencement de l'essai.

▼M7

Choix d'une série de plantes homogènes

47. Pour le dispositif expérimental A (une pousse par pot et trois pots par récipient), les pots sont choisis en fonction de leur homogénéité avant le début de l'essai. Pour le dispositif expérimental B (trois pousses par pot, un pot par récipient), les plantes surnuméraires sont retirées pour ne laisser que trois spécimens de taille et d'apparence uniformes.

Exposition via la phase aqueuse

48. Les pots, choisis en fonction de leur homogénéité, sont placés dans des récipients d'essai conformément au dispositif adopté. On y ajoute ensuite le milieu de Smart et Barko. Ce faisant, il faut prendre soin de ne pas perturber le sédiment. À cet effet, on peut utiliser un entonnoir pour verser le milieu, ou placer un disque en plastique pour couvrir le sédiment pendant que le milieu est versé dans les récipients d'essai, à condition que le disque soit retiré immédiatement après. Il est aussi possible de placer les pots dans les récipients d'essai après l'ajout du milieu. Dans tous les cas, on pourra utiliser du milieu nouvellement préparé au début de la phase d'exposition, s'il y a lieu de minimiser le risque de développement d'algues ou de bactéries, ou pour préparer des lots individuels de solution d'essai destinée aux réplicats.

49. La longueur de pousse qui dépasse du sédiment est mesurée, soit avant soit après l'ajout du milieu.

50. Les quantités appropriées de produit chimique d'essai peuvent être ajoutées au milieu avant que celui-ci soit versé dans les récipients d'essai. On peut également incorporer le produit chimique d'essai dans le milieu après qu'il a été ajouté aux récipients d'essai. Dans ce cas, il conviendra de veiller à ce que le produit chimique d'essai soit uniformément réparti dans l'ensemble du système d'essai, sans perturber le sédiment.

51. Dans tous les cas, l'apparence du milieu d'essai (limpide, trouble, etc.) au début de l'essai doit être consignée.

Exposition via le sédiment

52. On prépare les sédiments chargés à la concentration souhaitée en ajoutant directement une solution du produit chimique d'essai à du sédiment nouvellement préparé. Une solution mère du produit chimique d'essai dissous dans de l'eau désionisée est mélangée au sédiment reconstitué à l'aide d'un agitateur à rouleaux, d'un mélangeur pour aliments ou mélangée à la main. Si le produit chimique d'essai est peu soluble dans l'eau, il peut être dissous dans un volume aussi faible que possible d'un solvant organique adéquat (hexane, acétone ou chloroforme, par exemple). Cette solution est ensuite mélangée à environ 10 g de sable quartzique fin par récipient d'essai. On laisse le solvant s'évaporer, puis le sable est mélangé avec la quantité appropriée de sédiment pour un bécher. Seuls des agents très volatils peuvent être utilisés pour solubiliser, disperser ou émulsifier le produit chimique d'essai. Il faut garder à l'esprit que le volume et le poids du sable dopé avec le produit chimique d'essai doivent être pris en compte pour la préparation finale du sédiment (c'est-à-dire que le sédiment doit être préparé avec moins de sable). On s'assurera que le produit chimique d'essai ajouté au sédiment est totalement et uniformément réparti dans le sédiment.

53. Les pots sont remplis de sédiment dopé conformément à la méthode décrite précédemment. Les plantes présentant un système racinaire suffisant et choisies en fonction de leur homogénéité sont retirées des pots servant à la phase d'implantation et transplantées dans le sédiment chargé suivant la méthode exposée ci-dessus.

54. Les pots sont placés dans les récipients expérimentaux conformément au dispositif adopté. Le milieu de Smart et Barko est ensuite ajouté avec précaution (au moyen d'un entonnoir) pour éviter de perturber le sédiment. La longueur de pousse qui dépasse du sédiment est mesurée soit avant, soit après l'ajout du milieu.

▼M7

Maintien des niveaux d'eau pendant la durée de l'essai

55. Le volume final d'eau est consigné et le niveau de l'eau est marqué sur chaque récipient d'essai. Si plus de 10 % de l'eau s'évapore pendant l'essai, il convient d'en ajuster la quantité avec de l'eau distillée. Le cas échéant, il est possible de recouvrir les béchers de façon non hermétique avec une protection transparente, par exemple un couvercle en plastique transparent, afin de minimiser l'évaporation et la contamination par des spores d'algues.

Conditions expérimentales

56. On applique un éclairage fluorescent blanc chaud et/ou froid pour obtenir une énergie lumineuse d'environ 140 ± 20 $\mu E.m^{-2} \cdot s^{-1}$ en termes de rayonnement photosynthétiquement actif (400-700 nm) mesuré à la surface de l'eau, avec un cycle alternant 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. L'énergie lumineuse mesurée à la surface du milieu expérimental ne doit pas varier de plus de 15 % par rapport à la valeur choisie.

57. La température des récipients d'essai est maintenue à 20 ± 2 °C.

58. Le pH du milieu témoin ne doit pas augmenter de plus de 1.5 unité au cours de l'essai. Toutefois, un écart supérieur à 1,5 unité n'invalidera pas l'essai, si le respect des critères de validité spécifiés précédemment peut être démontré.

Durée de l'essai

59. La période d'exposition est de 14 jours.

Mesures et déterminations analytiques

60. Après la phase d'implantation et immédiatement avant l'exposition (soit au Jour 0), les plantes surnuméraires de cinq pots sélectionnés au hasard (conception à trois tiges par pot) ou de 15 pots (conception à une tige par pot) sont prélevées afin d'évaluer la longueur de la pousse ainsi que les poids frais et sec, comme indiqué ci-dessous.

61. Pour les plantes qui passent en phase d'exposition, procéder aux évaluations suivantes, récapitulées dans le tableau 1:

— Déterminer et noter la longueur de la tige principale, le nombre de tiges latérales et la longueur des tiges latérales au moins à la fin de la période d'exposition (par exemple, Jour 14).

— Déterminer visuellement et noter l'état de santé des végétaux au moins trois fois pendant la période d'exposition (par exemple, Jours 0, 7 et 14).

— Déterminer et noter les poids frais et sec des pousses à la fin de l'essai (Jour 14).

62. La longueur de la tige est mesurée avec une règle. Si la plante présente des tiges latérales, leur nombre et leur longueur sont également établis.

63. Les évaluations visuelles de l'état de santé des plantes s'effectuent en consignant l'aspect des végétaux et l'état général du milieu expérimental. Voici quelques-unes des observations à noter:

— nécrose, chlorose ou autre décoloration, comme un rougissement excessif par rapport aux plantes témoins;

— développement d'une contamination par des algues ou des bactéries;

— anomalies de croissance, par exemple retard de croissance, altération de l'intervalle entre deux nœuds, malformation des tiges ou des feuilles, prolifération des tiges latérales, perte de feuilles, baisse de la pression de turgescence et fragmentation de la tige;

▼M7

— évaluations visuelles de l'état de santé des racines à la fin de l'essai, en éliminant délicatement le sédiment des racines par lavage afin d'observer le système racinaire. L'échelle proposée ci-dessous est recommandée pour évaluer les organismes traités par rapport au groupe témoin:

1) absence de racines

2) développement racinaire faible

3) développement racinaire modéré

4) très bon développement racinaire, semblable à celui des témoins.

64. Le poids frais est déterminé au début et à la fin de l'essai en sectionnant la pousse au ras du sédiment, puis en séchant la partie sectionnée en la tamponnant avant de la peser. On veillera à éliminer les particules de sédiment susceptibles d'adhérer à la base de la pousse. Les tiges sont alors placées dans une étuve à environ 60 °C et déshydratées jusqu'à l'obtention d'un poids constant, avant une nouvelle pesée qui permet de relever le poids sec.

65. Le tableau 1 récapitule les évaluations biologiques minimales à effectuer au cours de l'essai.

Tableau 1

Programme d'évaluation

Jour post-exposition	*Myriophyllum spicatum*			
	Longueur de la tige, nombre et longueur des tiges latérales	Évaluation visuelle de l'état des pousses	Poids frais et poids sec de la pousse, Évaluation visuelle de l'état des racines	pH O_2
0	Oui	Oui	Oui	Oui
4	—	—	—	—
7	—	Oui	—	Oui
14	Oui	Oui	Oui	Oui

Oui: indique que les évaluations sont requises à cette date
—: indique que les évaluations ne sont pas nécessaires

Fréquence des mesures et des déterminations analytiques

66. La température du milieu est mesurée au moins une fois par jour dans un récipient d'essai supplémentaire maintenu dans les mêmes conditions que les autres dans l'enceinte de croissance, l'incubateur ou la pièce (ou mesurée en continu par un enregistreur de données).

67. Le pH et la concentration d'oxygène dissous du milieu sont vérifiés au début de l'essai, au moins une fois pendant l'essai et à la fin de l'essai dans tous les réplicats. Tous les jours où elles sont prévues, les évaluations sont effectuées à la même heure. Si, pour chaque concentration d'essai, on ne prépare qu'une solution globale pour remplir tous les réplicats, les déterminations au Jour 0 peuvent ne porter que sur ces solutions.

68. Il convient de mesurer l'énergie lumineuse dans l'enceinte de croissance, l'incubateur ou la pièce à des points situés au même niveau que la surface de la phase aqueuse. Ces mesures sont effectuées au moins une fois au début ou pendant l'essai. La méthode de détection et de mesure de la lumière, notamment le type de capteur, affectera la valeur mesurée. Les capteurs

▼M7

sphériques (qui détectent la lumière provenant de tous les angles situés au-dessus et en dessous du plan de mesure) et les capteurs «cosinus» (qui détectent la lumière provenant de tous les angles situés au-dessus du plan de mesure) sont préférables aux capteurs unidirectionnels et afficheront des valeurs plus élevées pour une source lumineuse multiple comme celle qui est décrite ici.

Mesures analytiques du produit chimique d'essai

69. Pour que l'application du produit chimique d'essai soit jugée satisfaisante, il convient de l'étayer par des analyses des concentrations d'essai.

70. On prélève des échantillons d'eau afin de doser le produit chimique pour toutes les concentrations d'essai peu après le début de l'essai (c'est-à-dire le jour de l'application pour les produits chimiques d'essai stables, ou une heure après l'application pour les produits chimiques instables) et à la fin de l'essai.

71. Il est nécessaire d'établir les concentrations dans le sédiment et dans l'eau interstitielle du sédiment au début et à la fin de l'essai, au moins pour la concentration la plus élevée, sauf s'il est attesté que les produits chimiques d'essai sont stables dans l'eau (> 80 % de la concentration nominale). Il n'est pas forcément nécessaire d'effectuer les dosages dans le sédiment et l'eau interstitielle si la répartition du produit chimique d'essai entre l'eau et le sédiment a été clairement déterminée par une étude eau/sédiment menée dans des conditions comparables (par exemple, en termes de rapport sédiment/eau, de méthode d'application ou de type de sédiment).

72. Le prélèvement des échantillons de sédiment au début de l'essai étant susceptible de perturber le système d'essai, des récipients traités supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires pour faciliter les mesures analytiques au début et à la fin de l'essai. De même, quand des évaluations intermédiaires sont jugées nécessaires, c'est-à-dire au Jour 7, et quand les analyses exigent des échantillons de sédiment importants qui ne peuvent être retirés facilement du système d'essai, les déterminations analytiques doivent être pratiquées sur des récipients expérimentaux supplémentaires exposés au même traitement que ceux qui servent aux évaluations biologiques.

73. Il est conseillé de séparer l'eau interstitielle par centrifugation, par exemple à 10 000 g et 4 °C pendant 30 minutes. Cependant, s'il est démontré que le produit chimique d'essai ne s'adsorbe pas sur les filtres, la filtration est également acceptable. Si la taille de l'échantillon est trop petite, il arrive que les concentrations dans l'eau interstitielle soient impossibles à établir.

74. Dans les essais semi-statiques (exposition via la phase aqueuse), où l'on prévoit que la concentration du produit chimique d'essai s'écartera de plus de 20 % de la concentration nominale pendant la durée de l'essai si les solutions expérimentales ne sont pas renouvelées, il convient de prélever des échantillons des solutions d'essai utilisées et fraîchement préparées afin d'y doser le produit chimique d'essai à chaque renouvellement.

75. Lorsque la concentration du produit chimique d'essai mesurée initialement ne se situe pas dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale, mais que suffisamment d'indices attestent que les concentrations initiales sont répétables et stables (c'est-à-dire dans l'intervalle de 80-120 % de la concentration initiale), les analyses chimiques peuvent n'être effectuées qu'aux concentrations d'essai maximale et minimale.

76. Dans tous les cas, il suffira de doser le produit chimique d'essai dans un seul réplicat pour chaque concentration expérimentale. Une autre option consiste à effectuer ces analyses en regroupant des échantillons de tous les réplicats pour chaque concentration.

77. S'il s'avère que la concentration du produit chimique d'essai a pu se maintenir tout au long de l'essai dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale ou mesurée initialement, l'analyse des résultats et les conclusions sur les effets étudiés qui en découlent peuvent s'appuyer sur les valeurs nominales ou mesurées initialement.

▼M7

78. Les concentrations entraînant des effets sont alors établies à partir des concentrations nominales ou mesurées dans la phase aqueuse au début de l'essai.

79. Cependant, s'il est attesté que la concentration a baissé (variation de plus de 20 % par rapport à la concentration nominale ou mesurée initialement dans le récipient traité) au cours de l'essai, l'analyse des résultats doit se fonder sur la moyenne géométrique de la concentration pendant l'exposition, ou sur des modèles décrivant la diminution de la concentration du produit chimique d'essai dans le récipient traité (11).

ÉVALUATION DES DONNÉES

80. S'il est nécessaire d'employer un solvant ou un dispersant, on pourra regrouper les données des témoins solvant et non traités pour effectuer les analyses statistiques, à condition que les résultats obtenus dans ces groupes non exposés et contenant le solvant ne présentent pas de différence statistiquement significative.

Variables de réponse

81. Cet essai a pour objectif de déterminer les effets du produit chimique d'essai sur le développement végétatif de l'espèce d'essai au moyen de deux variables de réponse, à savoir le taux de croissance spécifique moyen et le rendement:

Taux de croissance spécifique moyen

82. Cette variable de réponse est fondée sur l'évolution logarithmique de la longueur totale des tiges, du poids frais total et du poids sec total des pousses au cours du temps dans les groupes témoins et dans chaque groupe traité. Cette variable est calculée pour chaque réplicat de chaque groupe témoin ou traité. La longueur moyenne et le poids moyen des trois plantes d'un récipient (réplicat) et, par suite, le taux de croissance de chaque réplicat, sont calculés en appliquant la formule suivante:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln (N_j) - \ln (N_i)}{t}$$

où:

μ_{i-j}: taux de croissance spécifique moyen du temps i au temps j

N_i: variable de mesure dans le récipient témoin ou traité au temps i

N_j: variable de mesure dans le récipient témoin ou traité au temps j

t: période de temps comprise entre i et j

83. À partir des résultats relevés dans les réplicats, on calcule une valeur moyenne du taux de croissance ainsi que des estimations de la variance pour chaque groupe témoin ou traité.

84. On calcule le taux de croissance spécifique moyen sur l'ensemble de la période d'essai (le temps «i» mentionné dans la formule ci-dessus correspond au début de l'essai et le temps «j» à la fin de l'essai). Pour chaque concentration d'essai et chaque témoin, calculer la valeur moyenne du taux de croissance spécifique ainsi que les estimations de la variance.

▼M7

85. Le pourcentage d'inhibition du taux de croissance (I_t) peut ensuite être calculé pour chaque concentration expérimentale (groupe traité) selon la formule suivante:

$$\%I_t = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

où:

% I_t: pourcentage d'inhibition du taux de croissance spécifique moyen

μ_C: valeur moyenne de μ dans le groupe témoin (*control*)

μ_T: valeur moyenne de μ dans le groupe traité

Rendement

86. Cette variable de réponse est fondée sur l'évolution de la longueur totale des tiges, du poids frais total et du poids sec total des pousses au cours du temps dans les groupes témoins et dans chaque groupe traité. Le pourcentage moyen d'inhibition du rendement (%I_r) peut être calculé pour chaque groupe traité d'après la formule suivante:

$$\%I_r = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

où:

% I_r: pourcentage de réduction du rendement

b_C: biomasse finale moins biomasse de départ dans le groupe témoin (*control*)

b_T: biomasse finale moins biomasse de départ dans le groupe traité

Courbes concentration-effet

87. On trace des courbes concentration-effet décrivant le pourcentage d'inhibition moyen de la variable de réponse (I_t ou I_r, calculé comme indiqué précédemment) en fonction du logarithme de la concentration du produit chimique d'essai.

Estimation de la CE_x

88. Les estimations de la CE_x (par exemple, CE_{50}) s'appuient à la fois sur le taux de croissance spécifique moyen (C_xE_t) et, le cas échéant, sur le rendement (C_xE_r), chacune de ces variables de réponse découlant de la longueur totale des tiges, du poids frais total et du poids sec total des pousses.

89. Il convient de noter que les valeurs de la CE_x calculées à l'aide de ces deux variables de réponse ne sont pas comparables, et que cette différence est prise en compte lors de l'exploitation des résultats de l'essai. Les valeurs de la CE_x basées sur le taux de croissance spécifique moyen (C_xE_t) seront généralement supérieures à celles basées sur le rendement (C_xE_r) — si les conditions expérimentales de la présente méthode d'essai sont appliquées — en raison du fondement mathématique de chacune de ces approches. Cette différence n'est due qu'au calcul mathématique, il ne s'agit pas d'une différence de sensibilité entre les deux variables de réponse.

Méthodes statistiques

90. L'objectif consiste à obtenir une relation quantitative concentration-effet par une analyse de régression. Il est possible d'utiliser une régression linéaire pondérée après avoir effectué une transformation linéarisante des valeurs décrivant l'effet observé, par exemple dans des unités probit ou logit ou Weibull (13), mais il est préférable d'appliquer des méthodes de régression

▼M7

non linéaire, celles-ci traitant mieux les inévitables irrégularités de valeurs et les écarts par rapport aux distributions régulières. Proches de zéro ou de l'inhibition totale, ces irrégularités risquent d'être amplifiées par la transformation et d'interférer avec l'analyse (13). Notons que les méthodes d'analyse courantes faisant appel aux transformations probit, logit ou Weibull sont prévues pour analyser des réponses de type tout ou rien (mortalité ou survie, par exemple) et doivent être modifiées pour pouvoir être utilisées avec les valeurs du taux de croissance ou du rendement. Les références (14) (15) (16) et (17) décrivent des procédures spécifiques permettant de déterminer les valeurs de la CE_x à partir de données continues.

91. Pour chaque variable de réponse à analyser, utiliser la relation concentration-effet pour calculer des estimations ponctuelles des valeurs de CE_x. Les limites de confiance à 95 % sont établies pour chaque estimation et la validité de l'ajustement des données décrivant les effets au modèle de régression est à évaluer par un procédé statistique ou graphique. L'analyse de régression doit s'appuyer sur les effets relevés dans chaque réplicat et non sur les moyennes par groupe traité.

92. Les estimations de la CE_{50} et les limites de confiance peuvent aussi être obtenues par interpolation linéaire avec bootstrap (rééchantillonnage) (18), si les modèles ou les méthodes de régression disponibles ne conviennent pas aux données.

93. Afin d'estimer la CMEO, et par conséquent la CSEO, il est nécessaire de comparer les moyennes des groupes traités par une analyse de variance (ANOVA). La moyenne pour chaque concentration est alors comparée à la moyenne des témoins en faisant appel à une méthode appropriée, par exemple les tests de Dunnett ou de William (19) (20) (21) et (22). Il est nécessaire de vérifier si les hypothèses de distribution normale et d'homogénéité de la variance de l'ANOVA tiennent, à l'aide respectivement du test de Shapiro-Wilks et du test de Levene. L'infirmation des hypothèses de distribution normale et d'homogénéité de la variance peut quelquefois être corrigée par une transformation logarithmique des données. Si l'hétérogénéité de la variance et/ou la déviation de la loi normale sont extrêmes et ne peuvent être corrigées par une transformation, on envisagera d'effectuer l'analyse en appliquant des méthodes comme le test t de Welch avec correction de Bonferroni, le test de tendance régressif de Jonkheere-Terpstra ou le test des médianes de Bonferroni. La référence (16) livre des renseignements supplémentaires sur la détermination de la CSEO.

RAPPORT

94. Le rapport d'essai mentionne les informations suivantes:

Produit chimique d'essai

Substance mono-constituant:

— apparence physique, hydrosolubilité, autres propriétés physico-chimiques;

— identification chimique: nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

Substance multi-constituants, UVCBs et mélanges:

— caractérisée, autant que possible par p.ex. l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence quantitative et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants.

Espèce soumise à l'essai

— nom scientifique et source.

Conditions de l'essai

— durée et conditions de la phase d'implantation;

— procédé expérimental appliqué (statique ou semi-statique);

▼M7

— date du début de l'essai et durée de l'essai;

— milieu expérimental, c'est-à-dire sédiment et milieu nutritif liquide;

— description de la conception expérimentale: enceinte/pièce de croissance ou laboratoire, récipients expérimentaux et couvercles, volumes des solutions, longueur et poids des plantes par récipient expérimental au début de l'essai, rapport entre la superficie du sédiment et celle de l'eau, rapport entre le volume du sédiment et celui de l'eau;

— concentrations d'essai (nominales et mesurées selon les besoins) et nombre de réplicats par concentration;

— méthodes de préparation des solutions mères et des solutions d'essai, y compris utilisation éventuelle d'un solvant ou d'un dispersant;

— température durant l'essai;

— source de lumière, énergie lumineuse ($\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$)

— valeurs du pH dans les milieux des groupes témoins et traités, et aspect des milieux expérimentaux au début et à la fin de l'essai;

— concentrations d'oxygène;

— méthode d'analyse et données appropriées sur l'évaluation de la qualité (études de validation, écarts-types ou limites de confiance des analyses);

— méthodes de détermination des variables de mesure, par exemple longueur, poids sec, poids frais;

— tout écart par rapport à la présente méthode d'essai.

Résultats

— données brutes: longueur des tiges et poids des pousses par pot, et autres variables de mesure pour chaque récipient traité et témoin à chaque observation, et dates des analyses conformément au programme d'évaluation fourni dans le tableau 1;

— moyennes et écarts-types pour chaque variable de mesure;

— courbes de croissance pour chaque concentration;

— temps de doublement/taux de croissance chez les témoins d'après le poids frais et la longueur des tiges, y compris le coefficient de variation du rendement pour le poids frais;

— calcul des variables de réponse pour chaque réplicat traité, avec valeurs moyennes et coefficient de variation des réplicats;

— représentation graphique de la relation concentration-effet;

— estimation des effets toxiques pour les variables de réponse, par exemple CE_{50}, et intervalles de confiance associés. Si elles ont été calculées, la CMEO et/ou la CSEO ainsi que les méthodes statistiques utilisées pour les déterminer;

— si l'on a effectué une analyse de variance, puissance de l'effet détectable (par exemple, différence significative minimale);

— toute stimulation de la croissance constatée, le cas échéant, dans un groupe traité;

▼M7

— tout signe visuel de phytotoxicité et observations des solutions d'essai;

— discussion des résultats, notamment concernant une influence éventuelle de modifications apportées à la présente méthode d'essai sur les résultats de l'essai.

BIBLIOGRAPHIE

(1) *Chapitre C.26 de la présente annexe: Lemna sp. essai d'inhibition de la croissance*.

(2) Chapitre C.3 de la présente annexe: *Algues d'eau douce et cyanobactéries, essai d'inhibition de la croissance.*

(3) Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 January 2008.

(4) Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, Vol. 153, pp. 199-206.

(5) ISO 16191:2013 Qualité de l'eau — Détermination de l'effet toxique des sédiments sur la creoissance de Myriophyllum aquaticum.

(6) Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, Vol. 62/8, pp. 715-722.

(7) Chapitre C.50 de la présente annexe: Essai de toxicité sur *Myriophyllum spicatum* dans un système sans sédiment

(8) Chapitre C.28 de la présente annexe: *Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau chargée-sédiment*

(9) Ratte, M., H. Ratte (2014), «Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in a water-sediment system», Publications Santé et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 206, OCDE, Paris.

(10) Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron — a case study, Pest Management Science, Vol. 59/2, pp. 231 — 237.

(11) OCDE (2000), «Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures», Publications Santé et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 23, OCDE, Paris.

(12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, Vol. 21/3, pp. 251-263.

(13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, Vol. 18/9, pp. 713-718.

(14) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/2, pp. 157-167.

(15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/10, 1485-1494.

(16) OCDE (2006), «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application», Publications Santé et Sécurité de l'environnement de l'OCDE, Série sur les essais et l'évaluation, n° 54, OCDE, Paris.

(17) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, Vol. 29/2, pp/ 93-96.

▼**M7**

(18) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(19) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of the American Statistical Association, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.

(20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, Vol. 20/3, pp. 482-491.

(21) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics, Vol. 27/1, pp. 103-117.

(22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, Vol. 28/2, pp. 519-531.

▼**M7**

Appendice 1

COMPOSITION DU MILIEU DE SMART ET BARKO

Ingrédient	Quantité de réactif ajoutée à l'eau (*) (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	91,7
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	69,0
$NaHCO_3$	58,4
$KHCO_3$	15,4
pH (équilibre avec l'atmosphère)	7,9

(*) eau déminéralisée (distillée ou désionisée)

▼M7

Appendice 2

DÉFINITIONS

Biomasse: poids frais et/ou sec de la matière vivante présente dans une population. Dans cet essai, la biomasse comprend la tige principale, toutes les branches latérales et toutes les racines.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Chlorose: décoloration de l'organisme d'essai, en particulier des verticilles, passant du vert au jaune.

CE_x: concentration du produit chimique d'essai dissous dans le milieu expérimental qui entraîne une réduction de x % (par exemple 50 %) de la croissance de *Myriophyllum spicatum* pendant une période d'exposition définie (à mentionner explicitement si elle s'écarte de la durée normale ou totale de l'essai). Afin de distinguer les valeurs de la CE mesurées en fonction du taux de croissance de celles mesurées en fonction du rendement, on utilise les abréviations CE_t s'agissant du taux de croissance, et CE_r s'agissant du rendement, suivies par la mention de la variable de mesure utilisée, par exemple CE_r (longueur de la tige principale).

Croissance: augmentation de la variable de mesure, par exemple longueur de la tige principale, longueur totale des branches latérales, longueur totale des tiges, longueur totale des racines, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles, pendant la période d'essai.

Taux de croissance (taux de croissance spécifique moyen): accroissement logarithmique de la variable de mesure pendant la période d'exposition. *Note*: Les variables de réponse relatives au taux de croissance ne dépendent pas de la durée de l'essai tant que la croissance des organismes témoins non traités obéit à une loi exponentielle.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): concentration d'essai la plus faible à laquelle on observe que le produit chimique exerce un effet statistiquement significatif de réduction de la croissance (à $p < 0,05$) par comparaison avec le témoin, durant une période d'exposition donnée. Cependant, toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO devraient avoir un effet néfaste supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Si ces deux conditions ne sont pas réunies, il convient de justifier de façon détaillée le choix de la CMEO (et donc de la CSEO).

Variables de mesure: les variables de tout type qui sont mesurées pour exprimer le critère d'évaluation de l'effet au moyen d'une ou plusieurs variables de réponse. Dans la présente méthode d'essai, les variables de mesure sont la longueur de la tige principale, la longueur totale des branches latérales, la longueur totale des tiges, la longueur totale des racines, le poids frais, le poids sec et le nombre de verticilles.

Monoculture: culture monospécifique.

Nécrose: tissu mort (d'aspect blanc ou brun foncé) de l'organisme d'essai.

Concentration sans effet observé (CSEO): concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO.

Variable de réponse: variable permettant d'estimer la toxicité à partir de n'importe quelle variable mesurée décrivant la biomasse, selon différentes méthodes de calcul. Dans la présente méthode d'essai, le taux de croissance et le rendement représentent les variables de réponse dérivées des variables de mesure telles que la longueur de la tige principale, la longueur totale de tiges, le poids frais, le poids sec ou le nombre de verticilles.

Essai semi-statique: essai dans lequel la solution d'essai est renouvelée périodiquement à intervalles définis durant l'essai.

Essai statique: essai pendant lequel la solution d'essai n'est pas renouvelée.

▼M7

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Critère d'évaluation de l'effet: décrit le facteur général qui sera modifié, par rapport au témoin, par le produit chimique d'essai. Dans la présente méthode d'essai, le critère d'évaluation de l'effet est l'inhibition de la croissance, qui peut être exprimé par différentes variables de réponse dérivées d'une ou plusieurs variables de mesure.

Milieu expérimental: milieu de croissance synthétique complet dans lequel les plantes mises à l'épreuve se développent pendant qu'elles sont exposées au produit chimique d'essai. Normalement, le produit chimique d'essai est dissous dans le milieu expérimental.

UVCB: substance de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques

Rendement: valeur de la variable de mesure choisie pour exprimer la biomasse à la fin de la période d'exposition moins la valeur de cette variable au début de la période d'exposition. *Note*: Lorsque la croissance des organismes non exposés obéit à une loi exponentielle, les variables de réponse fondées sur le rendement diminuent quand la durée du test augmente.

▼M8

C.52. ÉTUDE ÉTENDUE DE TOXICITÉ POUR LA REPRODUCTION SUR UNE GÉNÉRATION CHEZ MÉDAKA (MEOGRT)

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice (LD) 240 (2015) de l'OCDE. L'étude étendue sur une génération chez médaka (*Medaka Extended One Generation Test*, MEOGRT) est un essai complet d'exposition sur plusieurs générations chez le poisson visant à obtenir des données pouvant servir à l'évaluation des dangers et des risques pour l'environnement liés aux produits chimiques, en particulier les produits suspectés d'être des perturbateurs endocriniens (PE). L'exposition dans l'essai MEOGRT est poursuivie jusqu'à l'éclosion (jusqu'à deux semaines post-fécondation, spf) dans la seconde génération (F2). Des investigations complémentaires seraient nécessaires pour justifier une extension éventuelle au-delà de l'éclosion à la génération F2; actuellement, les données disponibles ne fournissent pas d'éléments ou de critères justifiant une extension de la génération F2. Cependant, cette méthode d'essai pourra être mise à jour en fonction d'éventuelles informations ou données nouvelles. Il pourra ainsi être conseillé, dans certaines circonstances, d'étendre la génération F2 jusqu'à la reproduction (dans le cas de produits chimiques présentant un pouvoir élevé de bioconcentration, ou d'indications relatives à des effets transgénérationnels dans d'autres taxons). Cette méthode d'essai peut être utilisée pour l'évaluation des effets chroniques potentiels des produits chimiques, notamment ceux susceptibles d'avoir des effets perturbateurs sur le système endocrinien, chez le poisson. La méthode décrite vise principalement à mettre en évidence des effets potentiels pertinents au niveau d'une population (à savoir des impacts indésirables sur la survie, le développement, la croissance et la reproduction) afin de calculer une concentration sans effet observé (CSEO) ou une concentration efficace à × % (CE_x); il convient cependant de noter que les approches de type CE_x sont rarement adaptées aux études de grande ampleur de ce type, où l'augmentation du nombre de concentrations d'essai en vue de déterminer la CE_x souhaitée peut être impraticable et peut aussi poser des problèmes en termes de bien-être animal, compte tenu du grand nombre d'animaux utilisés. Pour les produits chimiques ne nécessitant pas une évaluation multigénérationnelle ou ne constituant pas des perturbateurs endocriniens potentiels, d'autres essais peuvent être plus adaptés (1). Le médaka japonais est l'espèce à utiliser pour cette méthode d'essai en raison de la brièveté de son cycle de vie et de la possibilité de déterminer son sexe génétique (2), qui est un élément clé pour cette méthode. Les méthodes et effets observés spécifiques décrits dans la présente méthode d'essai s'appliquent exclusivement au médaka japonais. D'autres espèces de petits poissons (le poisson-zèbre, par exemple) peuvent être adaptées à un protocole d'essai similaire.

2. Plusieurs effets biologiques sont mesurés dans la présente méthode d'essai. Il s'agit en premier lieu de mettre en évidence les effets indésirables potentiels sur des paramètres pertinents en termes de population, tels que la survie, le développement macroscopique, la croissance et la reproduction. En second lieu, afin de disposer d'informations mécanistiques et de pouvoir établir des liens entre les résultats d'autres types d'études de terrain ou de laboratoire établissant *a posteriori* une activité potentielle de perturbation du système endocrinien (activité androgénique ou œstrogénique dans d'autres tests et essais, par exemple), on obtient d'autres informations utiles en mesurant l'ARNm de la *vitellogénine (vtg)* (ou la protéine vitellogénine, VTG) et des caractères sexuels secondaires (CSS) phénotypiques liés au sexe génétique, et en procédant à une évaluation histopathologique. Il convient de noter que si un produit chimique d'essai ou ses métabolites ne sont pas suspectés d'être des PE, il est possible de se dispenser de mesurer ces effets secondaires, des études nécessitant moins de ressources et d'animaux étant alors plus appropriées (1). Les définitions utilisées dans cette méthode d'essai sont données à l'appendice 1.

▼**M8**

REMARQUES PRELIMINAIRES ET LIMITES

3. Étant donné le nombre limité de produits chimiques d'essais et le nombre limité de laboratoires impliqués dans l'étude de validation de cette méthode d'essai complexe, on peut s'attendre à ce que la méthode d'essai soit réexaminée et si nécessaire mise à jour à la lumière de l'expérience acquise. Ces données peuvent être utilisées au niveau 5 du Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens (3). La méthode d'essai commence par l'exposition de poissons adultes (génération F0) au produit chimique d'essai durant la phase de reproduction. L'exposition se poursuit durant les phases de développement et de reproduction à la génération F1 et la phase d'éclosion à la génération F2; l'essai permet donc d'évaluer les voies endocriniennes tant sur le plan structurel que sur celui de l'activation. Une approche fondée sur l'analyse du poids de la preuve peut être mise en œuvre dans l'interprétation des effets mesurés au niveau endocrinien.

4. Cet essai doit porter sur un nombre d'individus permettant de garantir une puissance suffisante à l'évaluation des effets relatifs à la reproduction (voir appendice 3), ce nombre ne dépassant pas toutefois le minimum requis eu égard au bien-être animal. Compte tenu du grand nombre d'animaux utilisés, il importe de considérer avec attention la nécessité de l'essai, en fonction des données existantes qui pourraient déjà comporter des informations pertinentes sur bon nombre des effets mesurés dans l'essai MEOGRT. Le document de l'OCDE *Fish Toxicity Testing Framework* (Série sur les essais et évaluations, n° 171) peut apporter une aide à cet égard (1).

5. La méthode d'essai a été conçue pour permettre la mise en évidence des effets d'une seule substance. Cependant, si un essai doit être réalisé sur un mélange, il convient de vérifier si les résultats seront acceptables dans le cadre réglementaire imposé.

6. Avant d'entamer l'essai, il est important de disposer d'informations sur les propriétés physico-chimiques du produit chimique d'essai, afin notamment de s'assurer de la stabilité des solutions de ce produit. Il est aussi nécessaire de maîtriser une méthode analytique suffisamment sensible permettant de vérifier les concentrations du produit chimique d'essai.

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. L'essai commence par l'exposition de mâles et de femelles sexuellement matures (au minimum 12 spf) par couples reproducteurs pendant 3 semaines, au cours desquelles le produit chimique d'essai est distribué dans l'organisme de la génération parentale (F0) selon le comportement toxicocinétique du produit. Le plus près possible du premier jour de la quatrième semaine, les œufs sont récoltés en vue d'obtenir la génération F1. Au cours de l'élevage de la génération F1 (15 semaines au total), le taux d'éclosion et la survie sont évalués. De plus, des poissons sont prélevés à 9-10 spf pour la mesure des effets sur le développement, et la ponte est évaluée sur trois semaines, de 12 à 14 spf. Une génération F2 est obtenue après la troisième semaine d'évaluation de la reproduction, et élevée jusqu'à la fin de l'éclosion.

CRITÈRES DE VALIDITÉ DE L'ESSAI

8. Les critères de validité de l'essai sont les suivants:

— La concentration d'oxygène dissous est ≥ 60 % de la valeur de saturation en air pendant tout l'essai;

— La température moyenne de l'eau pendant toute la durée de l'étude est comprise entre 24 et 26 °C. De brefs écarts par rapport à la moyenne dans certains aquariums n'excèdent pas 2 °C;

▼M8

— La fécondité moyenne des témoins dans chaque génération (F0 et F1) est supérieure à 20 œufs par couple et par jour. La fertilité de tous les œufs produits durant l'évaluation est supérieure à 80 %. De plus, 16 des 24 couples reproducteurs témoins recommandés (soit plus de 65 % d'entre eux) produisent plus de 20 œufs par couple et par jour;

— Le taux d'éclosion des œufs est ≥ 80 % (en moyenne) chez les témoins (dans chacune des générations F1 et F2);

— La survie après éclosion jusqu'à 3 spf et de 3 spf jusqu'à l'euthanasie pour la génération F1 (soit 15 spf) est ≥ 80 % (en moyenne) et ≥ 90 % (en moyenne) respectivement chez les témoins (F1);

— Les données disponibles démontrent que la concentration du produit chimique d'essai en solution a été correctement maintenue dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées.

En ce qui concerne la température de l'eau, bien que cela ne soit pas un critère de validité, les réplicats au sein d'un traitement ne doivent pas être statistiquement différents les uns des autres, et les groupes traités au sein d'un essai ne doivent pas être statistiquement différents les uns des autres (sur la base des températures mesurées quotidiennement, et en excluant les écarts de courte durée).

9. Bien qu'une baisse de la reproduction puisse être observée dans les groupes exposés aux concentrations les plus élevées, la reproduction devrait être suffisante, au moins dans le troisième groupe le plus exposé et tous les groupes les moins exposés de la génération F0, pour remplir les incubateurs éclosoirs. De plus, la survie embryonnaire dans le troisième groupe le plus exposé et les groupes les moins exposés de la génération F1 doit être de nature à permettre l'évaluation des effets mesurés lors du prélèvement subadulte (voir les paragraphes 36 et 38 et l'appendice 9). En outre, on doit observer au moins une survie post-éclosion minimale (~20 %) dans le second groupe le plus exposé de F1. Ces points ne sont pas des critères de validité, mais des recommandations visant à permettre le calcul des CSEO sur des bases solides.

10. Si un écart par rapport aux critères de validité de l'essai est observé, les conséquences doivent être appréciées au regard de la fiabilité des résultats de l'essai et ces écarts et leur appréciation doit être consignée dans le rapport d'essai.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

11. On utilise du matériel courant de laboratoire et en particulier:

(a) oxygénomètre et pH-mètre;

(b) instrument permettant de mesurer la dureté et l'alcalinité de l'eau;

(c) dispositif adéquat de régulation de la température avec, de préférence, une surveillance en continu;

(d) cuves en matériau chimiquement inerte et de capacité adaptée à la charge et à la densité de peuplement recommandées (voir appendice 3);

(e) balance suffisamment précise (précision de ± 0,5 mg).

▼M8

Eau

12. On utilise une eau dans laquelle l'espèce soumise à l'essai présente des taux adéquats de croissance et de survie à long terme. Cette eau doit être de qualité constante pendant la durée de l'essai. Pour s'assurer que l'eau de dilution ne puisse pas influer sur le résultat de l'essai (par complexation du produit chimique d'essai, par exemple) ou avoir des effets néfastes sur la performance des poissons géniteurs, on prélèvera des échantillons à différents intervalles pour analyse. Le dosage des métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, par exemple), des principaux anions et cations (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}, par exemple), des pesticides, du carbone organique total et des solides en suspension doit être effectué tous les six mois, par exemple, pour une eau de dilution connue pour être de qualité relativement constante. Certaines caractéristiques chimiques pour une eau de dilution acceptable sont énumérées à l'appendice 2. Le pH de l'eau doit se situer entre 6,5 et 8,5 et ne pas varier de au-delà de 0,5 unité au cours de l'essai.

Système d'exposition

13. La conception et les matériels utilisés pour le système d'exposition ne sont pas spécifiés. On utilisera pour la construction du système d'exposition du verre, de l'acier inoxydable ou d'autres matériaux chimiquement inertes qui n'auront pas été contaminés par de précédents essais. Pour cet essai, un système dynamique constituera par exemple un système d'exposition adapté (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Solutions d'essai

14. Une solution mère du produit chimique d'essai est introduite dans le système d'exposition à l'aide d'une pompe appropriée. Le débit de la solution mère doit être calibré d'après les données analytiques relatives aux solutions d'essai établies avant le début de l'exposition, et faire l'objet d'un contrôle volumétrique périodique au cours de l'essai. La solution d'essai est renouvelée dans chaque enceinte selon les besoins (minimum de 5 renouvellements en volume/jour, par exemple, et jusqu'à 16 renouvellements en volume/jour, soit un débit pouvant aller jusqu'à 20 m/min), selon la stabilité du produit chimique d'essai et la qualité de l'eau.

15. Des solutions d'essai sont ajustées à la concentration voulue par dilution d'une solution mère. La solution mère est, de préférence, préparée par simple mélange ou agitation du produit chimique d'essai dans l'eau de dilution par des moyens mécaniques (agitation et/ou ultrasons, par exemple). Des colonnes/systèmes de saturation ou des méthodes de dosage passif (14) peuvent être utilisés pour l'obtention d'une solution mère à la concentration voulue. On s'efforcera dans toute la mesure du possible d'éviter l'emploi de solvants et autres véhicules car: (1) certains solvants peuvent avoir eux-mêmes des effets toxiques et/ou induire des réponses indésirables ou inattendues, (2) l'essai de produits chimiques à une concentration supérieure à leur solubilité dans l'eau (ce qui arrive fréquemment si des solvants sont utilisés) peut fausser la détermination des concentrations efficaces, (3) le recours aux solvants dans les essais à long terme peut se traduire par la formation importante de biofilms associés à une activité microbienne, ce qui peut avoir un impact sur les conditions environnementales et sur la capacité de maintenir les concentrations d'exposition, et (4) en l'absence de données historiques démontrant que le solvant n'influe pas sur les résultats de l'étude, l'usage de solvants nécessite le traitement d'un groupe témoin avec solvant, ce qui a des effets significatifs en termes de bien-être animal, des animaux supplémentaires étant alors nécessaires pour la conduite de l'essai. Pour les produits chimiques difficiles à tester, un solvant peut être employé en dernier ressort, et l'on consultera alors le Document d'orientation de l'OCDE n° 23 sur les essais de toxicité aquatique des substances et mélanges «difficiles» (15) afin de déterminer la meilleure méthode à employer. Le solvant sera choisi en fonction des propriétés chimiques du produit chimique d'essai et de la disponibilité de données historiques sur l'utilisation du solvant. En cas de recours à un solvant comme véhicule, des témoins appropriés pour le solvant seront analysés en plus des témoins (négatifs) sans solvant (eau de dilution

▼M8

seule). Si le recours à un solvant est inévitable et si une activité microbienne (formation de biofilms) se produit, il est recommandé de noter/consigner dans le rapport la présence de biofilm dans chaque cuve (au moins une fois par semaine) pendant toute la durée de l'essai. Idéalement, la concentration de solvant devra être maintenue constante dans le témoin avec solvant et tous les groupes traités. Si la concentration de solvant n'est pas maintenue constante, c'est la concentration de solvant la plus forte dans le traitement d'essai qui sera utilisée chez le témoin avec solvant. Si un solvant est utilisé comme véhicule, les concentrations maximales de solvant ne devront pas dépasser 100 µl/l ou 100 mg/l (15), et il est recommandé de maintenir la concentration de solvant aussi bas que possible (< 20 µl/l, par exemple), pour éviter que le solvant puisse avoir une incidence sur les effets mesurés (16).

Animaux d'essai

Sélection et stabulation des poissons

16. L'espèce soumise aux essais est le médaka japonais *Oryzias latipes*, en raison de la brièveté de son cycle de vie et de la possibilité de déterminer son sexe génétique. Bien que d'autres espèces de petits poissons puissent convenir pour un protocole d'essai similaire, les méthodes et observations spécifiques décrites dans cette méthode d'essai s'appliquent exclusivement au médaka japonais (voir le paragraphe 1). Le médaka se prête bien à la reproduction en captivité; des méthodes ont été publiées pour sa culture (17) (18) (19), et l'on dispose de données d'essais sur la létalité à court terme, les premiers stades de la vie et le cycle de vie complet (5) (6) (8) (9) (20). Tous les poissons sont soumis à une photopériode de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité. Ils sont nourris avec des artémies vivantes, *Artemia* spp., nauplii qui peuvent être complétés par de la nourriture en flocons du commerce, si nécessaire. Des analyses pratiquées régulièrement sur les aliments en flocons doivent permettre de s'assurer qu'ils ne sont pas contaminés.

17. Dans la mesure où des méthodes d'élevage appropriées sont suivies, il n'est pas nécessaire d'appliquer un protocole de culture spécifique. Le médaka peut par exemple être élevé en cuves de 2 l avec 240 larves par cuve jusqu'à 4 spf, puis en cuves de 2 l avec 10 poissons par cuve jusqu'à 8 spf, après quoi les couples reproducteurs sont transférés dans des cuves de 2 l.

Acclimatation et sélection des poissons

18. Les poissons d'essai sont sélectionnés parmi une population de laboratoire issue d'une même lignée, qui aura été acclimatée pendant au moins deux semaines avant l'essai dans des conditions de qualité de l'eau et d'éclairage semblables à celles de l'essai (nota: cette période d'acclimatation n'est pas une période de pré-exposition *in situ*). Il est recommandé que les poissons d'essai soient obtenus par culture en interne, le transport des poissons adultes étant stressant et pouvant interférer avec une ponte fiable. Les poissons doivent être nourris de nauplii d'artémies deux fois par jour pendant toute la période d'élevage et la phase d'exposition, complétés si nécessaire par des aliments en flocons du commerce. Un minimum de 42 couples reproducteurs (54 couples si un témoin avec solvant est requis en raison, notamment, de l'absence de données historiques à l'appui de l'utilisation du seul témoin sans solvant) sont considérés comme nécessaires pour démarrer cet essai de façon à garantir la réplication adéquate. En outre, il convient de vérifier pour chaque couple reproducteur de la génération F0 qu'il s'agit bien d'un couple XX-XY (présentant pour chaque sexe la configuration normale de chromosomes sexuels), afin d'éviter l'inclusion possible de mâles spontanés XX (voir le paragraphe 39).

▼M8

19. Durant la phase d'acclimatation, la mortalité chez les poissons de culture doit être consignée, et les critères suivants s'appliquent après une période d'adaptation de 48 h:

— mortalité supérieure à 10 % de la population en culture dans les sept jours précédant le transfert vers le système d'essai: rejet du lot complet;

— mortalité comprise entre 5 % et 10 % de la population dans les sept jours précédant le transfert vers le système d'essai: acclimatation pendant sept jours en plus de la période d'acclimatation de 2 semaines; si la mortalité est supérieure à 5 % durant la seconde période de sept jours, rejet du lot complet;

— mortalité inférieure à 5 % de la population dans les sept jours précédant le transfert vers le système d'essai: acceptation du lot.

20. Les poissons ne doivent pas recevoir de traitement contre une maladie durant la période d'acclimatation de deux semaines précédant l'essai et durant la période d'exposition, et tout traitement doit être complètement évité si possible. Les poissons présentant des signes cliniques de maladies ne doivent pas être utilisés dans l'étude. Un relevé d'observations et de tout traitement prophylactique ou thérapeutique pendant la période de culture précédant l'essai doit être assuré.

21. La phase d'exposition débute avec des adultes sexuellement dimorphiques, génétiquement sexués, issus d'une population de laboratoire d'animaux sexuellement matures élevés à 25 ± 2 °C. Les poissons doivent être identifiés comme des reproducteurs avérés (ayant produit une descendance viable) dans la semaine précédant l'exposition. Pour tout le groupe de poissons utilisés lors de l'essai, la plage des poids individuels par sexe au début de l'essai ne doit pas sortir d'un intervalle de ± 20 % autour de la moyenne arithmétique des poids pour le même sexe. Un sous-échantillon de poissons sera pesé avant l'essai afin d'estimer le poids moyen. Les poissons sélectionnés doivent être au moins à 12 spf, et avoir un poids ≥ 300 mg pour les femelles et ≥ 250 mg pour les mâles.

CONCEPTION DE L'ESSAI

Concentrations d'essai

22. Il est recommandé d'utiliser cinq concentrations d'essai, en plus du/des témoin(s). Toutes les sources d'information doivent être prises en compte lors du choix de la gamme de concentrations d'essai, y compris les relations quantitatives structure-activité (QSAR), les données établies par la méthode des références croisées, les résultats d'essais sur les poissons tels que les essais de toxicité aiguë (chapitre C.1 de la présente annexe), l'essai de reproduction à court terme chez les poissons (chapitre C.48 de la présente annexe) et d'autres méthodes d'essai , comme les chapitres C.15, C.37, C.41, C.47 ou C.49 de la présente annexe (21) (22) (23) (24) (25) (26) si ces données sont disponibles ou, si nécessaire, les résultats d'un essai visant à déterminer la gamme des concentrations et couvrant éventuellement une phase de reproduction. Si un essai de détermination de la gamme des concentrations est nécessaire, il peut être conduit dans des conditions (qualité de l'eau, système d'essai, charge animale) similaires à celles de l'essai définitif. Si l'usage d'un solvant est nécessaire et qu'aucune donnée historique n'est disponible, l'essai de détermination de la gamme de concentrations peut être utilisé pour s'assurer de l'adéquation du solvant. La concentration d'essai la plus élevée ne doit pas dépasser la solubilité dans l'eau, 10 mg/l ou $1/10^{e}$ de la CL50 à 96 h (27). La concentration la plus basse doit être de 10 à 100 fois plus faible que la concentration la plus élevée.

▼M8

L'utilisation de cinq concentrations dans cet essai permet non seulement de mesurer les relations dose-réponse, mais fournit en outre la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et la CSEO requises pour l'évaluation des risques dans certains programmes à visée réglementaire ou contextes juridiques. En règle générale, le facteur d'espacement des concentrations nominales de produit chimique d'essai entre niveaux de traitement adjacents est ≤ 3,2.

Réplicats au sein des groupes traités et des témoins

23. Il convient d'utiliser un minimum de six enceintes réplicats par concentration d'essai (voir appendice 7). Pendant la phase de reproduction (excepté pour la génération F0), la structure de réplication est doublée pour l'évaluation de la fécondité et chaque réplicat comporte un seul couple reproducteur (voir paragraphe 42).

24. Outre la série de concentrations du produit chimique d'essai, on utilisera une enceinte témoin contenant de l'eau de dilution uniquement et, si nécessaire, une autre contenant uniquement le solvant dans l'eau. Le nombre d'enceintes réplicats doit être doublé pour les témoins, afin de garantir la puissance statistique requise (au moins douze réplicats devront être utilisés pour les témoins). Durant la phase de reproduction, le nombre de réplicats est doublé chez les témoins (soit 24 réplicats au minimum, chaque réplicat ne comportant qu'un seul couple reproducteur). Après la reproduction, les réplicats témoins ne doivent pas contenir plus de 20 embryons (poissons).

PROCÉDURE

Début de l'essai

25. Les poissons adultes sexuellement actifs utilisés pour démarrer la génération F0 de l'essai sont sélectionnés sur deux critères: âge (le plus souvent plus de 12 spf mais de préférence pas plus de 16 spf) et poids (à savoir femelles ≥ 300 mg et mâles ≥ 250 mg).

26. Les couples mâle-femelle répondant aux spécifications ci-dessus sont placés par couples individuels dans les cuves destinées à recevoir les réplicats, soit douze réplicats chez les témoins et six réplicats dans les groupes traités par le produit chimique au début de l'essai. Ces cuves sont assignées de façon aléatoire à un traitement (par exemple T1-T5 et témoin) et un réplicat (par exemple A-L témoins et A-F traités), puis placées dans le système d'exposition avec le débit approprié pour chaque cuve.

Conditions d'exposition

27. On trouvera à l'appendice 3 un récapitulatif complet des paramètres et conditions d'essai. Le respect de ces spécifications devrait se traduire chez les témoins par des valeurs mesurées similaires à celles indiquées à l'annexe4.

28. Au cours de l'essai, l'oxygène dissous, le pH et la température doivent être mesurés dans au moins un récipient d'essai pour chaque groupe traité et le groupe témoin. Ces mesures, à l'exception des mesures de température, doivent être réalisées au moins une fois par semaine pendant la période d'exposition. La température moyenne de l'eau pendant toute la durée de l'étude doit se situer entre 24 et 26 °C. La température doit être mesurée chaque jour pendant la période d'exposition. Le pH de l'eau doit se situer entre 6,5 et 8,5 et ne pas varier de au-delà de 0,5 unité au cours de l'essai. Les réplicats au sein d'un traitement ne doivent pas différer statistiquement les uns des autres, et les groupes traités au sein de l'essai ne doivent pas différer statistiquement les uns des autres (sur la base des mesures quotidiennes de température, et en excluant de brefs écarts).

▼M8

Durée d'exposition

29. L'essai expose des poissons sexuellement aptes à la reproduction en commençant par la génération F0, exposée pendant trois semaines. A la semaine 4, approximativement au 24e jour d'essai, la génération F1 est mise en place, les couples reproducteurs F0 sont euthanasiés et leur poids et leur longueur sont consignés (voir paragraphe 34). La génération F1 est ensuite exposée pendant plus de 14 semaines (15 semaines au total pour F1) et la génération F2 est exposée pendant deux semaines jusqu'à l'éclosion. La durée totale de l'essai est en principe de 19 semaines (jusqu'à l'éclosion de F2). Le déroulement chronologique de l'essai est représenté au tableau 2 et expliqué en détail à l'appendice 9.

Régime alimentaire

30. Les poissons peuvent être nourris ad libitum d'artémies (*Artemia* spp., nauplii âgés de 24 heures), complétées si nécessaire par des aliments en flocons du commerce. Il convient d'analyser régulièrement les aliments en flocons pour s'assurer qu'ils ne sont pas contaminés par des pesticides organochlorés, des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ou des polychlorobiphényles (PCB). Les aliments présentant un niveau élevé de substances agissant sur le système endocrinien (c'est-à-dire de phyto-œstrogènes) qui pourraient compromettre la réponse à l'essai sont à éviter. Les aliments non consommés et les matières fécales doivent être retirés des récipients d'essai par des méthodes appropriées, par exemple par un nettoyage soigneux du fond de chaque cuve au moyen d'un siphon. Les côtés et le fond de chaque cuve doivent également être nettoyés une ou deux fois par semaine (par grattage avec une spatule, par exemple). On trouvera à l'appendice 5 un exemple de régime alimentaire. Les doses distribuées sont fonction du nombre de poissons par réplicat. Elles sont donc réduites en cas de mortalité dans un réplicat.

Dosages analytiques et mesures

31. Avant le début de la période d'exposition, il convient de vérifier le bon fonctionnement du système de distribution du produit chimique. Toutes les méthodes analytiques nécessaires doivent être établies, et il faut disposer d'une connaissance suffisante de la stabilité du produit chimique dans le système d'essai. Durant l'essai, les concentrations de produit chimique d'essai sont déterminées à des intervalles appropriés, de préférence une fois par semaine sur un réplicat pour chaque groupe traité, en changeant chaque semaine de réplicat dans un même groupe.

32. Au cours de l'essai, les débits de diluant et de solution mère doivent être vérifiés à intervalles réguliers (au minimum trois fois par semaine, par exemple). Il est recommandé de fonder les résultats sur les concentrations mesurées. Cependant, si la concentration du produit chimique d'essai en solution a été correctement maintenue tout au long de l'essai dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées, les résultats pourront être calculés à partir des valeurs nominales ou mesurées. Dans le cas de produits chimiques présentant une accumulation marquée chez le poisson, les concentrations d'essai pourront décroître au fur et à mesure de la croissance des poissons. En pareil cas, il est recommandé d'adapter le taux de renouvellement de la solution d'essai dans chaque cuve afin que les concentrations d'essai restent aussi constantes que possible.

Observations et effets mesurés

33. Les effets mesurés sont la fécondité, la fertilité, l'éclosion, la croissance et la survie, l'objectif étant d'évaluer les effets possibles au niveau de la population. Des observations du comportement doivent également être réalisées chaque jour, et tout comportement inhabituel doit être consigné. Les autres effets mesurés, d'ordre mécanistique, sont les niveaux hépatiques d'ARN messager de la vitellogénine (ARNm *vtg*) ou de protéine VTG établis par immuno-essai ((28), par exemple), les marqueurs sexuels phénotypiques tels que les papilles de la nageoire anale caractéristiques du mâle, l'évaluation histologique du sexe gonadique et l'évaluation histopathologique des reins, du foie et des gonades (voir la liste des effets mesurés au tableau 1). Tous ces effets spécifiques sont évalués dans le contexte de la détermination du

▼M8

sexe génétique de l'individu, basée sur la présence ou l'absence du gène *dmy* déterminant le sexe masculin chez médaka (voir le paragraphe 41). Le délai de ponte est également évalué. En outre, un sex-ratio phénotypique simple peut être établi sur la base des informations fournies par le comptage des papilles de la nageoire anale, permettant de définir les individus comme mâle ou femelle du point de vue phénotypique. La présente méthode d'essai ne saurait détecter des déviations modérées par rapport au sex-ratio attendu, car le nombre relativement faible de poissons par réplicat n'apporte pas une puissance statistique suffisante. Aussi, lors de l'évaluation histopathologique, les gonades sont évaluées et des analyses beaucoup plus puissantes sont réalisées pour la détermination du phénotype gonadique dans le contexte du sexe génétique.

34. L'objectif premier de cette méthode d'essai est d'évaluer les effets potentiels au niveau d'une population d'un produit chimique d'essai. Les effets mécanistiques mesurés (VTG, CSS et certains effets histopathologiques touchant les gonades) peuvent également aider à déterminer s'il existe un effet médié par une activité endocrinienne. Cependant, ces effets d'ordre mécanistique peuvent aussi être influencés par une toxicité systémique ou autre. On pourra donc aussi évaluer plus précisément l'histopathologie hépatique et rénale dans le but de mieux comprendre les éventuelles réponses au niveau des effets mécanistiques mesurés. Toutefois, si ces évaluations précises ne sont pas réalisées, les anomalies macroscopiques observées incidemment lors de l'évaluation histopathologique devront néanmoins être relevées et consignées dans le rapport.

Euthanasie des poissons

35. A la fin de l'exposition des générations F0 et F1 et lorsqu'un sous-échantillon de poissons subadultes est prélevé, les poissons sont euthanasiés à l'aide de quantités appropriées de solution anesthésique (par exemple tricaïne méthanesulfonate, MS-222 (CAS.886-86-2), 100-500 mg/l) tamponnés avec 300 mg/l de $NaHCO_3$ (bicarbonate de sodium, CAS.144-55-8)) destinées à réduire l'irritation de la membrane muqueuse. Si les poissons montrent des signes de souffrance considérable (i.e. sévères et que leur mort est prévisible) et que leur état est moribond, les animaux doivent être anesthésiés puis euthanasiés, et traités comme des cas de mortalité lors de l'analyse des données. Quand un poisson est euthanasié dans ce cas sévère, il faut le consigner dans le rapport d'essai. En fonction du moment de l'essai ou le poisson est euthanasié, il peut être retenu pour une analyse histopathologique, en fixant le spécimen préalablement à une analyse future.

Manipulation des œufs et des larves

Récolte des œufs des couples reproducteurs en vue de la reproduction de la génération suivante

36. Les œufs sont récoltés le premier jour (ou les deux premiers jours, si nécessaire) de la semaine d'essai 4 entre F0 et F1 et de la semaine d'essai 18 entre F1 et F2. La semaine d'essai 18 correspond à des poissons adultes F1 de 15 spf (semaines post-fécondation). Il importe que tous les œufs soient retirés de chaque cuve la veille de la récolte des œufs, afin que tous les œufs récoltés pour un couple reproducteur proviennent d'une seule et même ponte. Après la ponte, la femelle médaka transporte parfois ses œufs près de l'orifice anal en attendant de pouvoir les déposer sur un substrat. En l'absence de substrat dans la cuve, les œufs peuvent se trouver soient attachés à la femelle soit au fond de la cuve. Selon leur emplacement, ils seront prélevés avec précaution sur la femelle ou siphonnés depuis le fond de la cuve à la semaine d'essai 4 de F0 et la semaine d'essai 18 de F1. Tous les œufs récoltés au sein d'un traitement sont réunis avant d'être répartis dans les chambres d'incubation.

▼M8

37. Les filaments qui maintiennent ensemble les œufs pondus doivent être retirés. Les œufs fécondés (jusqu'à 20 œufs) sont récoltés pour chaque couple reproducteur (1 couple par réplicat), regroupés par traitement et répartis de façon systématique dans les chambres d'incubation appropriées (appendices 6 et 7). Un bon microscope à dissection permet d'observer les marques du début de la fertilisation/du développement, telles que le gonflement de la membrane de fertilisation (chorion), la progression de la division cellulaire ou la formation de la blastula. Les chambres d'incubation peuvent être placées dans des «aquariums incubateurs» distincts pour chaque traitement (dans lesquels il faut alors mesurer les paramètres de qualité de l'eau et les concentrations de produit chimique d'essai) ou dans l'aquarium de réplicats qui contiendra les larves écloses (éleuthéroembryons, par exemple). Si un deuxième jour de récolte est nécessaire (23^{e} jour d'essai), tous les œufs des deux jours doivent être réunis et répartis systématiquement entre les réplicats de traitement.

Élevage des œufs jusqu'à l'éclosion

38. Les œufs fécondés sont agités continuellement, par exemple par des bulles d'air dans l'incubateur, ou par agitation verticale de l'incubateur. Les décès d'œufs fécondés (embryons) sont observés et consignés quotidiennement. Les œufs morts sont retirés des incubateurs (appendice 9). Au 7^{e} jour post-fécondation (jpf), l'agitation est stoppée ou réduite de telle sorte que les œufs fécondés se déposent au fond de l'incubateur. Cela favorise l'éclosion, généralement le jour ou les deux jours suivants. Pour chaque traitement et témoin, on compte les alevins (jeunes larves; éleuthéroembryons) (en regroupant les réplicats). Les œufs fécondés qui n'ont pas éclos au terme de deux fois le jour médian de l'éclosion chez les témoins (généralement à 16 ou 18 jpf) sont considérés comme non viables et écartés.

39. Douze alevins sont transférés dans chaque cuve de réplicat. Les alevins des chambres d'incubation sont réunis et répartis de façon systématique dans les cuves de réplicats (appendice 7). On peut à cet effet sélectionner de façon aléatoire un alevin du lot traité et ajouter séquentiellement un alevin par tirage en aveugle dans un aquarium pour réplicat. Chacune des cuves doit contenir un nombre égal (n=12) de larves écloses (au maximum 20 larves dans chaque cuve). S'il n'y a pas suffisamment d'alevins pour remplir tous les réplicats de traitements, il est recommandé de veiller à ce que le plus grand nombre de réplicats possible comportent 12 alevins. Les alevins peuvent être manipulés en toute sécurité au moyen de pipettes en verre de grand diamètre. Les alevins en surnombre sont euthanasiés au moyen d'un anesthésique. Durant les quelques semaines précédant la constitution des couples reproducteurs, le jour où est observée la première ponte doit être consigné pour chaque réplicat.

Constitution des couples reproducteurs

Prélèvement tissulaire et détermination du sexe génotypique

40. La détermination du sexe génotypique par prélèvement tissulaire au niveau d'une nageoire est réalisée à la spf 9-10 (c'est-à-dire la semaine d'essai 12-13 pour la génération F1). Tous les poissons d'une cuve sont anesthésiés (par des méthodes approuvées, IACUC, par exemple) et un petit échantillon de tissu est prélevé à l'extrémité dorsale ou ventrale de la nageoire caudale de chaque poisson, afin de déterminer le sexe génotypique de l'individu (29). Les poissons d'un réplicat peuvent être placés dans de petites cages, si possible avec un poisson par cage, dans la cuve réplicat. Il est également possible de placer deux poissons par cage s'ils présentent des signes distinctifs. On peut à cet effet pratiquer des coupes différentes lors du prélèvement au niveau de la nageoire caudale (l'une à l'extrémité dorsale et l'autre à l'extrémité ventrale, par exemple).

▼M8

41. Le sexe génotypique du médaka est déterminé par un gène identifié et séquencé (*dmy*) situé sur le chromosome Y. La présence de *dmy* indique un individu XY, quel que soit le phénotype, et l'absence de *dmy* indique un individu XX, quel que soit le phénotype (30) (31). De l'acide désoxyribonucléique (ADN) est extrait de chaque prélèvement et la présence ou l'absence de *dmy* est établie par réaction en chaîne par polymérase (PCR) (voir l'appendice 9 du chapitre C.41 de la présente annexe ou les appendices 3 et 4 dans (29)).

Mise en place des couples reproducteurs

42. Les informations sur le sexe génotypique sont utilisées pour établir des couples reproducteurs XX-XY, indépendamment du phénotype externe, qui peut être altéré par l'exposition à un produit chimique d'essai. Le lendemain de la détermination du sexe génotypique de chaque poisson, deux poissons XX et deux poissons XY de chaque réplicat sont sélectionnés de façon aléatoire et deux couples XX-XY sont mis en place. Si un réplicat ne comporte pas deux poissons XX ou deux XY, il convient de trouver des poissons appropriés dans d'autres réplicats au sein du traitement. La priorité est d'avoir le nombre recommandé de réplicats de couples reproducteurs pour chaque traitement (12) et chez les témoins (24). Les poissons présentant des anomalies apparentes (problèmes de vessie natatoire, malformations spinales, tailles extrêmes, etc.) sont à écarter lors de la mise en place des couples reproducteurs. Lors de la phase de reproduction à la génération F1, chaque cuve réplicat doit contenir un seul couple reproducteur.

Prélèvement de subadultes et évaluation des effets mesurés

Prélèvement de couples non reproducteurs

43. Après la constitution des couples reproducteurs, les poissons non sélectionnés pour la reproduction sont euthanasiés, afin de mesurer les effets à la semaine d'essai 12-13 (F1). Il est extrêmement important de manipuler les poissons de telle sorte que le sexe génotypique déterminé pour la sélection des couples reproducteurs puisse encore être tracé pour chaque poisson. Toutes les données recueillies sont analysées dans le contexte du sexe génotypique de chaque individu. Chaque poisson est utilisé pour une série de mesures incluant: la détermination du taux de surviedes poissons juvéniles/subadultes (semaines d'essai 7-12/13 (F1)), la croissance en longueur (il est possible de mesurer la taille standard si la nageoire caudale a été raccourcie lors du prélèvement tissulaire visant à déterminer le sexe génétique; on mesurera la longueur totale si le prélèvement n'a porté que sur la partie dorsale ou ventrale de la nageoire caudale) et la masse corporelle (à savoir le poids frais, à sec), l'ARNm *vtg* (ou la VTG) hépatique et les papilles de la nageoire anale (voir les tableaux 1 et 2). Il faut noter que le poids et la longueur des couples reproducteurs sont également requis pour le calcul de la croissance moyenne au sein d'un groupe traité.

Prélèvement tissulaire et mesure de la vitellogénine

44. Le foie est extrait par dissection et stocké à ≤ -70 °C jusqu'à la mesure de l'ARNm *vtg* (ou de la VTG). La queue du poisson, y compris la nageoire anale, est conservée dans un fixateur approprié (de Davidson, par exemple) ou photographiée de telle sorte qu'il soit possible de compter plus tard les papilles de la nageoire anale. On peut si on le souhaite prélever également d'autres tissus (gonade, par exemple) et les conserver. La concentration de VTG hépatique doit être quantifiée par une technique ELISA homologue (voir les procédures recommandées pour médaka à l'appendice 6 du chapitre C.48 de la présente annexe). Une autre solution consiste à quantifier l'ARNm *vtg*, par extraction de l'ARNm du gène *vtg I* d'un prélèvement

▼M8

hépatique et quantification du nombre de copies du gène *vtg I* (par ng d'ARNm total), par PCR quantitative, selon les méthodes établies par l'U.S. EPA (29). Au lieu de déterminer le nombre de copies du gène *vtg* dans les groupes témoins et les groupes traités, une méthode plus économique en ressources et moins difficile du point de vue technique consiste à déterminer le changement relatif (facteur multiplicatif), dans l'expression du gène *vtg I*, entre groupe témoin et groupes traités.

Caractères sexuels secondaires

45. Dans des circonstances normales, seul le médaka mâle sexuellement mature présente des papilles, qui se développent sur les plaques de jonction de certains rayons de la nageoire anale et constituent un caractère sexuel secondaire pouvant servir de biomarqueur pour les effets perturbateurs endocriniens. La méthode de comptage des papilles de la nageoire anale (nombre de plaques de jonction présentant des papilles) est décrite à l'appendice 8. Le nombre de papilles de la nageoire anale par individu est en outre utilisé pour classer les individus comme phénotype externe mâle ou femelle et établir ainsi un sex-ratio simple pour chaque réplicat. Tout médaka présentant un nombre de papilles supérieur à 0 est défini comme mâle tout médaka présentant 0 papille au niveau de la nageoire anale est défini comme femelle.

Évaluation de la fécondité et de la fertilité

46. La fécondité et la fertilité sont évaluées lors des semaines 1 à 3 à la génération F0 et des semaines 15 à 17 à la génération F1. Les œufs de chaque couple reproducteur sont récoltés chaque jour pendant 21 jours consécutifs. Ils sont retirés avec précaution de sous le ventre des femelles (placées dans un filet) et/ou siphonnés du fond de l'aquarium tous les matins. La fécondité et la fertilité sont consignées chaque jour pour chaque couple réplicat. La fécondité est définie comme le nombre d'œufs pondus, et la fertilité est définie fonctionnellement comme le nombre d'œufs fécondés et viables au moment du comptage. Le comptage doit intervenir dès que possible après la récolte.

47. La fécondité des réplicats est consignée chaque jour, c'est le nombre d'œufs par couple reproducteur; l'analyse par les procédures statistiques recommandées porte sur les moyennes des réplicats. La fertilité des réplicats est la somme des nombres d'œufs fertiles produits par un couple reproducteur divisée par la somme des nombres d'œufs produits par ce couple. Statistiquement, la fertilité est analysée comme un taux par réplicat. Le taux d'éclosion des réplicats correspond au nombre d'alevins divisé par le nombre d'embryons chargés (20 généralement). Statistiquement, le taux d'éclosion est analysé comme un taux par réplicat.

Prélèvement d'adultes et évaluation des effets mesurés

Prélèvement de couples reproducteurs

48. Après la semaine d'essai 17 (c'est-à-dire après le démarrage réussi de la génération F2), les adultes F1 sont euthanasiés et divers effets sont évalués (voir tableaux 1 et 2). La nageoire anale est examinée pour évaluer les papilles (voir appendice 8), et/ou la queue est retirée au niveau immédiatement postérieur à l'orifice anal et fixée pour un comptage ultérieur des papilles. Une partie de la nageoire caudale peut être prélevée et archivée à ce moment-là pour vérification du sexe génétique (*dmy*), si on le souhaite. Il est possible de pratiquer si nécessaire un prélèvement tissulaire pour répéter la recherche du *dmy* et vérifier le sexe génétique de certains poissons. La cavité corporelle est ouverte pour qu'il soit possible de pratiquer une perfusion avec des fixateurs appropriés (de Davidson, par exemple) avant immersion du corps entier dans le fixateur. Cependant, si une étape de perméabilisation appropriée est réalisée avant la fixation, il n'est pas nécessaire d'ouvrir la cavité corporelle.

▼M8

Histopathologie

49. Chaque poisson fait l'objet d'une évaluation histopathologique à la recherche de pathologies du tissu gonadique (29) (30). Comme on l'a vu au paragraphe 33, des effets mécanistiques évalués dans cet essai (VTG, CSS et certains effets histopathologiques gonadiques) peuvent être influencés par une toxicité systémique ou autre. L'évaluation histopathologique détaillée du foie et des reins peut donc aider à comprendre les réponses au niveau des effets mécanistiques mesurés. Cependant, si ces évaluations détaillées ne sont pas réalisées, les anomalies macroscopiques observées incidemment lors de l'évaluation histopathologique doivent être relevées et consignées dans le rapport. Une «lecture descendante», depuis le groupe le plus exposé (par rapport aux témoins) jusqu'au traitement sans effet, peut être envisagée; il est cependant recommandé de se reporter au document d'orientation sur l'histopathologie de l'EPA (29). En règle générale, les coupes histologiques de tous les prélèvements sont préparées avant d'être lues par le pathologiste. Si l'on utilise une «lecture descendante», il est noté que la procédure Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS) est fondée sur l'anticipation d'une augmentation de l'impact biologique (de la pathologie) lorsque les niveaux de dose augmentent. On perd donc de la puissance si l'on considère uniquement une dose élevée, sans aucune dose intermédiaire. Si une analyse statistique n'est pas nécessaire pour déterminer que la dose élevée est sans effet, cette approche peut être acceptable. Le phénotype gonadique découle également de cette évaluation.

Autres observations

50. L'essai MEOGRT fournit des données utilisables (par exemple dans une approche fondée sur l'analyse du poids de la preuve) pour évaluer simultanément au moins deux grands types de voies intervenant dans les effets indésirables (*adverse outcome pathways*, AOP) qui aboutissent à des effets sur la reproduction: (a) des voies à médiation endocrine impliquant une perturbation de l'axe endocrinien hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG); et (b) des voies se traduisant par une réduction de la survie, de la croissance (longueur et poids) et de la reproduction du fait d'une toxicité à médiation non endocrine. Des effets classiquement mesurés dans les essais de toxicité chronique tels que l'essai sur le cycle de vie complet et l'essai sur les premiers stades de la vie sont également inclus dans cet essai et peuvent être utilisés pour évaluer les dangers présentés à la fois par les modes d'action toxique à médiation non endocrine et les voies à médiation endocrine. Au cours de l'essai, il convient d'observer quotidiennement les comportements, et tout comportement inhabituel doit être noté. De plus, toute mortalité doit être notée et on calculera la survie jusqu'à la sélection des poissons (semaine d'essai 6/7), la survie après la sélection jusqu'au prélèvement subadulte (9-10 spf) et la survie depuis la constitution des couples jusqu'au prélèvement de poissons adultes.

Tableau 1

Effets mesurés dans l'essai MEOGRT (*)

Stade de la vie	Effet mesuré	Génération
Embryon (2 spf)	Éclosion (% et délai d'éclosion)	F1, F2
Juvénile (4 spf)	Survie	F1
Subadulte (9 or10 spf)	Survie	F1
	Croissance (longueur et poids)	

▼**M8**

Stade de la vie	Effet mesuré	Génération
	Vitellogénine (ARNm ou protéine)	
	Caractères sexuels secondaires (papilles de la nageoire anale)	
	Sex-ratio externe	
	Délai jusqu'à la 1re ponte	
Adulte (12-14 spf)	Reproduction (fécondité et fertilité)	F0, F1
Adulte (15 spf)	Survie	F1
	Croissance (longueur et poids)	
	Caractères sexuels secondaires (papilles de la nageoire anale)	
	Histopathologie (gonade, foie, rein)	

(*) Ces effets mesurés doivent faire l'objet d'une analyse statistique

DÉROULEMENT CHRONOLOGIQUE

51. Le tableau 2 illustre le déroulement chronologique de l'essai. L'essai MEOGRT comprend 4 semaines d'exposition des adultes F0 et 15 semaines d'exposition de la génération F1, ainsi qu'une période d'exposition de la seconde génération (F2) jusqu'à l'éclosion (2 spf). L'appendice 9 récapitule les différentes étapes du début à la fin de l'essai MEOGRT.

Tableau 2

Chronologie de l'exposition et des effets mesurés au cours de l'essai MEOGRT

MEOGRT chronologie de l'exposition et des effets mesurés

F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																		1	2
Semaine d'essai	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Stade de la vie					**Embryon**					**Larve**					**Juvénile**			**Subadulte**	**Adulte**
Effets mesurés																			
Fécondité	F_0														F_1				
Fertilité	F_0														F_1				
Éclosion					F_1														F_2
Survie						F_1						F_1						F_1	
Croissance				F_0								F_1						F_1	
Vitellogénine												F_1							
Carac. sex. secondaires												F_1						F_1	
Histopathologie																		F_1	
Semaine d'essai	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- Plan expérimental: 7 groupes de réplicats
  - 5 traités par le produit chimique d'essai
  - 2 témoins (4 si un solvant est utilisé)
- Plan intragroupe
  - 12 réplicats pour la reproduction, la pathologie adulte et les CSS (sem. 10 à 18)
  - 6 réplicats pour l'éclosion, la survie, la Vtg ; et CSS et croissance subadultes (sem. 1 à 9)

CSS: caractères sexuels secondaires ; sem.: semaines;
Vtg: vitellogénine

▼M8

RÉSULATS ET RAPPORT

Analyse statistique

52. Le sexe génotypique étant déterminé pour tous les poissons de l'essai, les données doivent être analysées séparément pour chaque sexe génotypique (mâles XY et femelles XX). Le non-respect de cette exigence réduirait grandement la puissance statistique de l'analyse. Il est préférable d'effectuer ces analyses statistiques en suivant les procédures décrites dans le document de l'OCDE sur les méthodes actuelles d'analyse statistique des données d'écotoxicité (*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (32). L'appendice 10 fournit des orientations pour l'analyse statistique.

53. La conception de l'essai et le choix des tests statistiques doivent assurer la puissance requise pour permettre de déceler les changements d'importance biologique concernant les effets pour lesquels une CSEO doit être établie (32). La consignation dans le rapport des concentrations et paramètres ayant un effet significatif peut dépendre du cadre réglementaire. Il convient d'identifier pour chaque effet mesuré quel pourcentage de changement il importe de détecter ou d'estimer. Le plan expérimental doit être adapté en conséquence. Il est peu probable que la même variation en pourcentage s'applique à tous les effets mesurés, et que l'on puisse concevoir une expérience réalisable qui remplisse ces critères pour tous les effets mesurés, aussi importe-t-il, lors de la conception de l'expérience, de se concentrer sur les effets qui sont importants pour cette dernière. On trouvera à l'appendice 10 un ordinogramme d'analyse statistique et des orientations destinés à faciliter le traitement des données et le choix des tests ou modèles statistiques les plus appropriés. D'autres méthodes statistiques peuvent être utilisées si elles sont scientifiquement fondées.

54. Il sera nécessaire d'analyser les variations au sein de chaque ensemble de réplicats en utilisant l'analyse de la variance ou des méthodes avec tableau de contingence, ainsi que des méthodes d'analyse statistique suffisantes et adaptées fondées sur cette analyse. Pour opérer des comparaisons multiples entre les résultats obtenus pour chaque concentration et ceux obtenus avec les témoins, une procédure descendante (test de Jonckheere-Terpstra, par exemple) est recommandée en cas de réponses continues. Si les données ne sont pas compatibles avec une relation concentration-réponse monotone, le test de Dunnett ou le test de Dunn sera utilisé (après transformation adéquate des données, si nécessaire).

55. Pour la fécondité, le décompte des œufs a lieu chaque jour, mais peut être analysé dans sa globalité ou comme une mesure répétée. L'appendice 10 précise comment analyser ces données. Pour les données histopathologiques exprimées sous la forme d'indices de gravité, un nouveau test statistique, le Rao-Scott Chochran-Armitage by Slices (RSCABS) a été développé (33).

56. Tout effet mesuré dans les groupes traités par le produit chimique qui diffère de façon significative de témoins appropriés doit être consigné dans le rapport.

Considérations relatives à l'analyse des données

Niveaux de traitement compromis

57. Plusieurs facteurs entrent en jeu pour déterminer si un réplicat ou l'intégralité d'un traitement présentent des signes d'une toxicité manifeste et s'il convient alors de les exclure de l'analyse. Une toxicité manifeste se caractérise par une mortalité supérieure à quatre individus dans un réplicat entre 3 spf et 9 spf, mortalité qui ne saurait être imputable à une erreur technique. Les autres signes de toxicité manifeste sont notamment les hémorragies, les comportements anormaux, les nages anormales, l'anorexie ainsi que tout autre signe

▼M8

clinique de maladie. Pour les signes sub-létaux de toxicité, des évaluations qualitatives peuvent être nécessaires et devraient toujours être réalisées en référence au groupe témoin pour l'eau de dilution (eau pure). Si une toxicité manifeste apparaît dans le(s) groupe(s) le(s) plus exposé(s), il est recommandé d'écarter ces traitements de l'analyse.

Témoins avec solvant

58. L'utilisation d'un solvant ne doit être envisagée qu'en dernier ressort, après avoir considéré toutes les autres options pour l'administration du produit chimique. Si un solvant est utilisé, il est impératif de mettre en place conjointement un témoin pour l'eau de dilution. A la clôture de l'essai, les effets potentiels du solvant font l'objet d'une comparaison. Pour cela, les résultats correspondant au groupe témoin avec solvant sont comparés à ceux du groupe témoin avec eau de dilution. Les relevés d'observation les plus pertinents dans ce cadre concernent les déterminants de la croissance (poids), qui peuvent être affectés en cas d'effets toxiques généralisés. Si des différences statistiquement significatives sont décelées pour ces paramètres entre le groupe témoin avec eau de dilution et le groupe témoin avec solvant, un avis d'expert doit permettre de déterminer si la validité de l'essai est compromise. Si les deux témoins diffèrent, les groupes exposés au produit chimique doivent être comparés au témoin avec solvant, sauf si l'on sait qu'il est préférable de les comparer au témoin avec eau de dilution. S'il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes témoins, il est recommandé de comparer les groupes exposés au produit chimique d'essai avec l'ensemble des deux groupes (témoin solvant et témoin eau de dilution), sauf si l'on sait qu'il est préférable de les comparer soit au groupe témoin avec eau de dilution soit au témoin avec solvant.

Rapport d'essai

59. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Produit chimique d'essai: nature physique et propriétés physico-chimiques pertinentes;

— Données d'identification chimique.

Substance mono-constituant:

— apparence physique, hydro-solubilité et autres propriétés physico-chimiques pertinentes;

— identification chimique, telle que désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. (y compris la teneur en carbone organique, si cela se justifie).

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges:

— caractérisés autant que possible par l'identité chimique (voir ci-dessus), la teneur et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants.

Espèce soumise à l'essai:

— Nom scientifique, souche (si possible), origine et méthode de collecte des œufs fécondés et de manipulation ultérieure.

Conditions d'essai:

— Photopériode(s);

— Conception de l'essai: dimensions des enceintes, matériel et volume d'eau, nombre d'enceintes d'essai et de réplicats, nombre d'alevins par réplicat, etc.;

▼**M8**

— Méthode de préparation des solutions mère et fréquence de renouvellement (l'agent solubilisant et sa concentration doivent être indiqués le cas échéant);

— Méthode de dosage du produit chimique d'essai: pompes doseuses, systèmes de dilution, etc.;

— Efficacité de récupération de la méthode et concentrations d'essai nominales, limite de quantification, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types dans les récipients d'essai, méthode analytique utilisée et données montrant que les mesures se réfèrent aux concentrations du produit chimique d'essai en solution vraie;

— Caractéristiques de l'eau de dilution: pH, dureté, température, concentration d'oxygène dissous, taux de chlore résiduel (si mesuré), carbone organique total (si mesuré), solides en suspension (si mesurés), salinité du milieu d'essai (si mesurée) et toute autre mesure effectuée;

— Concentrations d'essai nominales, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types;

— Qualité de l'eau dans les récipients d'essai: pH, température (quotidiennement) et concentration d'oxygène dissous;

— Informations détaillées sur l'alimentation: types d'aliments, provenance, quantité distribuée et fréquence, etc.

Résultats:

— Données attestant que les témoins répondent à l'ensemble des critères de validité;

— Données relatives au groupe témoin (plus témoin avec solvant le cas échéant) et aux groupes traités: éclosion (taux et délai d'éclosion) pour F1 et F2, survie après éclosion pour F1, croissance (longueur et poids corporel) pour F1, sexe génotypique et différenciation sexuelle (par exemple caractères sexuels secondaires d'après les papilles de la nageoire anale et l'histologie gonadique) pour F1, sexe phénotypique pour F1, caractères sexuels secondaires (papilles de la nageoire anale) pour F1, ARNm de la *vtg* (ou protéine VTG) pour F1, évaluation histopathologique (gonade, foie et rein) pour F1 et reproduction (fécondité et fertilité) pour F0, F1; (voir les tableaux 1 et 2).

— Méthodes d'analyse statistique (analyse de régression ou analyse de la variance) et de traitement des données (tests et modèles statistiques utilisés);

— Concentration sans effet observé (CSEO) pour chacune des réponses évaluées;

— Concentration minimale avec effet observé (CMEO) pour chacune des réponses évaluées (à p=0.05); CE_x pour chacune des réponses évaluées, le cas échéant, et intervalles de confiance (à 90 % ou 95 %), graphique du modèle ajusté utilisé pour calculer la CE_x, pente de la courbe concentration-réponse, formule du modèle de régression, estimation des paramètres du modèle et de leurs erreurs-types

— Tout écart par rapport à la présente méthode d'essai et aux critères d'acceptation, et considérations relatives aux conséquences susceptibles d'en découler pour les résultats de l'essai.

▼M8

60. En ce qui concerne les résultats de la mesure des effets, on présentera les valeurs moyennes et leurs écarts-types (par réplicat et par concentration, si possible).

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Série sur les essais et évaluations (N° 171), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(2) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. Current Protocols in Toxicology 39: 1-36.

(3) OCDE (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Série sur les essais et évaluations (N° 150), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(4) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. Water Research 16: 457–464.

(5) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 19: 1925-1930.

(6) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552-2560.

(7) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17β-Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Chemosphere 47: 71–80.

(8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 21: 1692-1698.

(9) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-T*ert*-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1487-1496.

(10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. Aquatic Toxicology 79: 288-295.

(11) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. Aquatic Toxicology 77: 78-86.

(12) Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes).* Journal of Applied Toxicology 35:11-23.

(13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Available at: http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html.

(14) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. Chemosphere 86: 593-599.

▼**M8**

(15) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Série sur les essais et évaluations (N° 23), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(16) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

(17) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.

(18) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). Biology of Reproduction 61: 1287-1293.

(19) Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.

(20) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety 54: 330-338.

(21) Chapitre C.15 de la présente annexe, Poisson, essai de toxicité à coourt terme aux stades de l'embryon et de l'alevin.

(22) Chapitre C.37 de la présente annexe , Essai de 21 jours sur les Poissons: essai de dépistage à court terme de l'activité oestrogénique et androgénique, et de l'inhibition de l'aromatase.

(23) Chapitre C.41 de la présente annexe, Essai de développement sexuel des poissons.

(24) Chaptitre C.48 de la présente annexe, Essai à court terme de reproduction des poissons.

(25) Chapitre C.47 de la présente annexe , Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie.

(26) Chapitre C.49 de la présente annexe, Poisson, essai de toxicité aiguë au stade embryonnaire.

(27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Viv*o Endocrine Screening Assays. Chemosphere 92: 1067-1076.

(28) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301-308.

(29) OCDE (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Série sur les essais et évaluations (N° 227), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. Genetics 163: 245–251.

(31) Shinomiya, A, Otake H. Togashi K. Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, Zoological Science 21: 613-619.

(32) OCDE (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (Les annexes de cette publication constituent un document à part), Publications de l'OCDE, Paris.

(33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1108-1116.

▼**M8**

Appendice 1

DÉFINITIONS

Produit chimique: une substance ou un mélange.

ELISA: essai d'immuno-absorption enzymatique (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Fécondité = nombre d'œufs.

Fertilité = nombre d'œufs viables/fécondité;

Longueur à la fourche (LF): longueur mesurée de l'extrémité du museau à l'extrémité du rayon central de la nageoire caudale, utilisée lorsqu'il est difficile de dire où se termine la colonne vertébrale du poisson (www.fishbase.org).

Taux d'éclosion: alevins/nombre d'embryons chargés dans un incubateur.

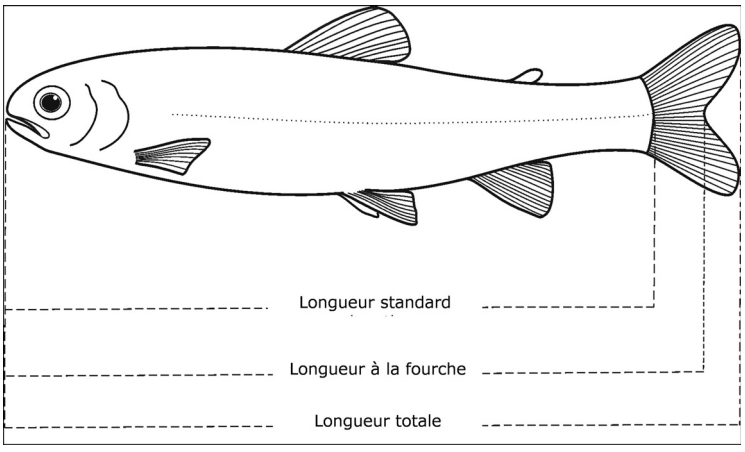
IACUC: Comité institutionnel du soin et de l'utilisation des animaux (*Institutional Animal Care and Use Committee*)

Longueur standard (LS): longueur mesurée de l'extrémité du museau à l'extrémité postérieure de la dernière vertèbre ou à l'extrémité postérieure de la partie médio-latérale de la plaque hypurale. Autrement dit, cette mesure ne prend pas en compte la longueur de la nageoire caudale (www.fishbase.org).

Longueur totale (LT): longueur de l'extrémité du museau à l'extrémité du lobe le plus long de la nageoire caudale, généralement mesurée après avoir comprimé les lobes le long de la ligne médiane. La mesure se fait en ligne droite, sans suivre la courbe du corps (www.fishbase.org).

Figure 1

Description des différentes longueurs utilisées



CEx: (Concentration efficace à x %) concentration qui engendre un effet de x % sur les organismes d'essai durant une période d'exposition déterminée, en comparaison avec un témoin. Par exemple, la CE50 est la concentration estimée produire un effet sur un paramètre évalué de l'essai dans 50 % d'une population exposée durant une période d'exposition déterminée.

Essai dynamique: essai caractérisé par l'écoulement continu des solutions d'essai dans le système d'essai pendant la durée de l'exposition.

Axe HHG: axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

▼**M8**

IUPAC: Union internationale pour la chimie pure et appliquée (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).

Taux de charge: poids frais de poisson par volume d'eau.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): concentration la plus basse d'un produit chimique d'essai à laquelle on observe un effet statistiquement significatif (à $p < 0,05$) par comparaison avec le témoin. Cependant, toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO devraient avoir un effet nocif supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Si ces deux conditions ne sont pas réunies, il convient de justifier de façon détaillée le choix de la CMEO (et donc de la CSEO). Les appendices 5 et 6 donnent des indications à ce sujet.

Concentration létale médiane (CL50): concentration d'un produit chimique d'essai dont on estime qu'elle provoquera la mort de 50 % des organismes d'essai au cours de l'essai.

Concentration sans effet observé (CSEO): concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO qui, par comparaison avec un témoin, n'a pas d'effet statistiquement significatif (à $p < 0,05$) durant une période d'exposition déterminée.

SMILES: Spécification d'écriture moléculaire linéaire simplifiée (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*).

Densité de peuplement: nombre de poissons par unité de volume d'eau.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode.

UVCB: substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériaux biologiques.

VTG: (vitellogénine) phospholipoglycoprotéine précurseur des protéines du vitellus normalement présente chez les femelles sexuellement actives de toutes les espèces ovipares.

SPF: semaine post-fécondation

▼**M8**

Appendice 2

QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ACCEPTABLE

Substance	Concentration limite
Matière particulaire	5 mg/l
Carbone organique total	2 mg/l
Ammoniac non ionisé	1 µg/l
Chlore résiduel	10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux plus polychlorobiphényles	50 ng/l
Chlore organique total	25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arsenic	1 µg/l
Chrome	1 µg/l
Cobalt	1 µg/l
Cuivre	1 µg/l
Fer	1 µg/l
Plomb	1 µg/l
Nickel	1 µg/l
Zinc	1 µg/l
Cadmium	100 ng/l
Mercure	100 ng/l
Argent	100 ng/l

▼**M8**

Appendice 3

CONDITIONS D'ESSAI POUR LE MEOGRT

1.	Espèce recommandée	Médaka japonais (*Oryzias latipes*)
2.	Type d'essai	Dynamique (flux continu)
3.	Température de l'eau	La température nominale de l'essai est de 25 °C. La température moyenne dans chaque cuve pendant toute la durée de l'essai est de 24-26 °C
4.	Qualité de l'éclairage	Ampoules fluorescentes (large spectre et ~150 lumens/m^2) (~150 lux)
5.	Photopériode	16 h de lumière pour 8 h d'obscurité
6.	Taux de charge	F0: 2 adultes/réplicat; F1: démarrage avec au maximum 20 œufs (embryons)/réplicat, réduit à 12 embryons/réplicat à l'éclosion puis 2 adultes (couple reproducteur XX-XY) à 9-10 spf pour la phase de reproduction
7.	Volume utile minimal des enceintes d'essai	1,8 l (exemple de dimensions d'une enceinte: 18x9x15 cm)
8.	Renouvellement de la solution d'essai, en volume	Minimum de 5 renouvellements en volume/jour jusqu'à 16 renouvellements en volume /jour (ou débit de 20 ml/min)
9.	Âge des organismes d'essai au démarrage	F0: > 12 spf sans dépasser de préférence 16 spf
10.	Nombre d'organismes par réplicat	F0: 2 poissons (couple mâle et femelle); F1: maximum 20 poissons (œufs)/réplicat (produits par les couples reproducteurs F0 et F1)
11.	Nombre de traitements	5 traitements par le produit chimique d'essai plus témoin(s) approprié(s)
12.	Nombre de réplicats par traitement	Minimum de 6 réplicats par traitement pour le produit chimique d'essai et minimum de 12 réplicats pour le témoin, ainsi que pour le témoin avec solvant le cas échéant (le nombre de réplicats est doublé pendant la phase de reproduction à la génération F1)
13.	Nombre d'organismes par essai	Minimum de 84 poissons à la génération F0 et 504 à la génération F1 (en cas de témoin avec solvant, 108 poissons pour F0 et 648 pour F1); l'unité de comptage est le post-éleuthéro-embryon.
14.	Régime alimentaire	Les poissons sont nourris d'artémies (*Artemia* spp., nauplii âgés de 24 heures) *ad libitum*, complétées si nécessaire par des aliments en flocons du commerce (on trouvera à l'appendice 5 un exemple de régime alimentaire assurant une croissance et un développement adéquats pour une reproduction soutenue)

▼**M8**

15. Aération	Aucune, sauf si l'oxygène dissous tend vers des valeurs inférieures à 60 % de la valeur de saturation en air
16. Eau de dilution	Eau de surface propre, eau de source ou eau reconstituée, ou eau du robinet déchlorée
17. Période d'exposition	En principe 19 semaines (de F0 à l'éclosion de F2)
18. Effets biologiques mesurés (principaux)	Taux d'éclosion (F1 et F2); survie (F1, de l'éclosion à 4 spf (fin des larves/début des juvéniles), de 4 à 9 (ou 10) spf (du début des juvéniles aux subadultes) et de 9 à 15 spf (de subadultes à euthanasie des adultes)); croissance (F1, longueur et poids à 9 et 15 spf); caractères sexuels secondaires (F1, papilles de la nageoire anale à 9 et 15 spf); vitellogénine (F1, ARNm *vtg* ou protéine VTG à 15 spf); sexe phénotypique (F1, via l'histologie des gonades à 15 spf); reproduction (F0 et F1, fécondité et fertilité pendant 21 jours); délai d'éclosion (F1); histopathologie (F1, gonade, foie et rein à 15 spf)
19. Critères de validité de l'essai	Oxygène dissous ≥ 60 % de la valeur de saturation en air; température moyenne de l'eau de 24-26 °C pendant tout l'essai; reproduction réussie ≥ 65 % des femelles chez le(s) témoin(s); fécondité quotidienne moyenne ≥ 20 œufs chez le(s) témoin(s); taux de fécondité ≥ 80 % (en moyenne) chez les témoins (dans chacune des générations F1 et F2); survie après éclosion jusqu'à 3 spf ≥ 80 % (en moyenne) et de 3 spf jusqu'à l'euthanasie de la génération ≥ 90 % (en moyenne) chez les témoins (F1), la concentration du produit chimique d'essai en solution doit être maintenue de façon satisfaisante dans un intervalle de ± 20 % autour de la valeur moyenne des mesures.

▼**M8**

Appendice 4

VALEURS GÉNÉRALEMENT OBTENUES CHEZ LES TÉMOINS

Il faut noter que les valeurs suivantes obtenues chez les témoins reposent sur un nombre limité d'études de validation, et pourront être corrigées à la lumière de données nouvelles.

Croissance

Le poids et la longueur sont mesurés sur tous les poissons prélevés à 9 (ou 10) et 15 semaines post-fécondation (spf). Selon ce protocole, le poids frais attendu à 9 spf est de 85-145 mg pour les mâles et de 95-150 mg pour les femelles. Le poids attendu à 15 spf est de 250-330 mg pour les mâles et de 280-350 mg pour les femelles. S'il peut y avoir des écarts notables par rapport à ces plages pour certains individus, un poids moyen chez les témoins s'écartant notablement de ces valeurs, en particulier s'il est inférieur, suggérera des problèmes d'alimentation, de régulation de la température, de qualité de l'eau ou de maladie, ou une combinaison de plusieurs de ces facteurs.

Éclosion

Le taux d'éclosion chez les témoins se situe généralement autour de 90 %, bien que des valeurs ne dépassant pas 80 % ne soient pas exceptionnelles. Un taux d'éclosion inférieur à 75 % peut être le signe d'une agitation insuffisante des œufs au cours de leur développement ou de soin insuffisant apporté aux œufs, tel qu'un retrait trop tardif des œufs morts entraînant une infestation fongique.

Survie

Les taux de survie jusqu'à 3 spf depuis l'éclosion et après 3 spf sont généralement de 90 % ou plus chez les témoins, mais des taux de survie ne dépassant pas 80 % aux premiers stades de la vie chez les témoins ne sont pas alarmants. Des taux de survie inférieurs à 80 % sont préoccupants et peuvent indiquer un nettoyage insuffisant des aquariums, entraînant la perte de larves par maladie ou asphyxie due à de faibles niveaux d'oxygène dissous. La mortalité peut aussi résulter de blessures lors du nettoyage des cuves ou de la perte de larves dans le système de vidange des cuves.

Gène de la vitellogénine

Si les niveaux absolus de gène de la vitellogénine (*vtg*), exprimés en nombre de copies/ng d'ARNm total, peuvent varier considérablement entre laboratoires selon les procédures ou l'instrumentation utilisées, le niveau de *vtg* devrait être près de 200 fois plus élevé chez les témoins femelles que chez les témoins mâles. Il n'est pas rare que ce ratio atteigne 1 000 à 2 000, cependant des ratios inférieurs à 200 sont suspects et peuvent indiquer des problèmes de contamination des échantillons ou des problèmes liés à la procédure et/ou aux réactifs utilisés.

Caractères sexuels secondaires

Pour les mâles, la plage normale des caractères sexuels secondaires, définis comme le nombre total de segments avec papilles dans les rayons de la nageoire anale, est de 40-80 segments à 9-10 spf. A 15 spf, la plage devrait être de 80-120 chez les mâles et 0 chez les témoins femelles. Pour des raisons inexpliquées, dans de rares cas, certains mâles ne présentent pas de papilles à 9 spf, mais comme tous les témoins mâles développent des papilles à 15 spf, cela tient probablement à un retard de développement. La présence de papilles chez les témoins femelles indique la présence de mâles XX dans la population.

▼**M8**

Mâles XX

L'incidence normale de mâles XX chez les poissons de culture semble être de l'ordre de 4 % au maximum à 25 °C, cette incidence augmentant lorsque la température augmente. Il convient de prendre des mesures pour limiter la proportion de mâles XX dans la population. L'incidence des mâles XX ayant une composante génétique et étant par conséquent transmissible, un moyen efficace de réduire l'incidence des mâles XX dans la population est de surveiller l'élevage et de veiller à ce que des mâles XX ne soient pas utilisés pour la reproduction.

Activité reproductrice (frai)

Le frai chez les réplicats témoins doit être suivi quotidiennement avant l'évaluation de la fécondité. On peut évaluer visuellement, d'un point de vue qualitatif, si les couples témoins frayent. A 12-14 spf, la plupart des couples témoins devraient frayer. Si le nombre de couples frayant est faible à ce stade, cela indique des problèmes potentiels de santé, de maturité ou de bien-être des poissons.

Fécondité

A 12-14 spf, la femelle médaka en bonne santé et bien nourrie pond généralement chaque jour de 15 à 50 œufs. La production d'œufs pour 16 des 24 couples reproducteurs témoins recommandés (> 65 %) devrait dépasser 20 œufs par couple et par jour et peut atteindre quelque 40 œufs par jour. Une production inférieure peut indiquer des problèmes d'immaturité, de malnutrition ou de mauvaise santé des couples reproducteurs.

Fertilité

Le pourcentage d'œufs fertiles chez les couples reproducteurs témoins est généralement de l'ordre de 90 %, des valeurs de 95 % et plus n'étant pas rares. Des taux de fertilité inférieurs à 80 % chez les œufs témoins sont suspects et peuvent signaler soit des individus en mauvaise santé, soit des conditions de culture laissant à désirer.

▼**M8**

Appendice 5

EXEMPLE DE RÉGIME ALIMENTAIRE

On trouvera au tableau 1 un exemple de régime alimentaire assurant une croissance et un développement adéquats pour une reproduction soutenue. Il est possible de s'écarter du régime proposé mais il est alors recommandé de procéder à des tests afin de s'assurer que la croissance et la reproduction sont acceptables. Pour suivre le régime suggéré, il faut, avant de commencer l'essai, déterminer le poids sec d'artémies par volume de purée semi-liquide d'artémies. Pour cela, peser un volume donné de cette purée après l'avoir séchée pendant 24 heures à 60 °C sur des plateaux pré-pesés. Pour tenir compte du poids du sel dans la purée semi-liquide, il convient de sécher et peser également un volume identique de la solution salée utilisée dans la purée semi-liquide, et de soustraire le poids du sel du poids obtenu pour la purée d'artémies séchée. Une autre solution consiste à filtrer et rincer les artémies à l'eau distillée avant de les sécher, ce qui évite d'avoir à mesurer le poids d'un échantillon contenant uniquement du sel. Ces informations permettent de convertir les données du tableau 1 (poids sec d'artémie) en volume de purée semi-liquide d'artémies à administrer à chaque poisson. Il est en outre recommandé de peser chaque semaine des aliquotes de purée d'artémies pour vérifier que le poids sec administré est correct.

Tableau 1

Exemple de régime alimentaire.

Jours (après éclosion)	Artémies (mg poids sec/poisson/jour)
Jour 1	0,5
Jour 2	0,5
Jour 3	0,6
Jour 4	0,7
Jour 5	0,8
Jour 6	1,0
Jour 7	1,3
Jour 8	1,7
Jour 9	2,2
Jour 10	2,8
Jour 11	3,5
Jour 12	4,2
Jour 13	4,5
Jour 14	4,8
Jour 15	5,2
Jour 16-21	5,6

▼**M8**

Jours (après éclosion)	Artémies (mg poids sec/poisson/jour)
Semaine 4	7,7
Semaine 5	9,0
Semaine 6	11,0
Semaine 7	13,5
Semaine 8-sacrifice	22,5

▼**M8**

Appendice 6

EXEMPLES DE CHAMBRES D'INCUBATION DES ŒUFS

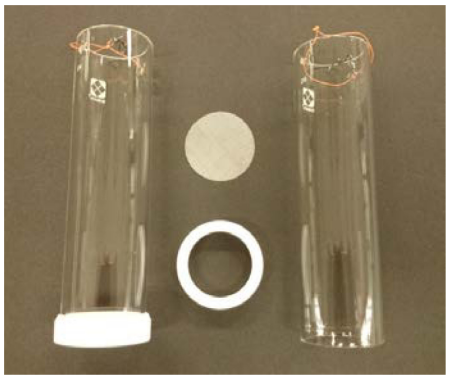
Exemple A





Cet incubateur consiste en un tube à centrifuger en verre présentant une découpe transversale, connecté par un manchon en acier inoxydable et maintenu à son sommet par un bouchon vissant pour centrifugeuse. Un petit tube en verre ou en acier inoxydable traversant le bouchon et positionné près du fond arrondi de l'incubateur assure une diffusion douce de bulles d'air ayant pour fonction de mettre les œufs en suspension et de réduire la transmission par des organismes saprophytes d'infections fongiques entre les œufs, tout en facilitant les échanges chimiques entre l'incubateur et la cuve où il est placé.

Exemple B



▼**M8**



Cet incubateur est constitué d'un corps cylindrique en verre (5 cm de diamètre et 10 cm de hauteur) et d'une grille métallique inoxydable (0.25 φ et 32 mesh) maintenue au fond du corps cylindrique par un anneau en PTFE. Les incubateurs sont suspendus par une barre à mouvement vertical au-dessus d'un réservoir et agités verticalement (avec une amplitude de 5 cm environ) selon un cycle approprié pour les œufs de médaka (une fois toutes les 4 secondes environ).

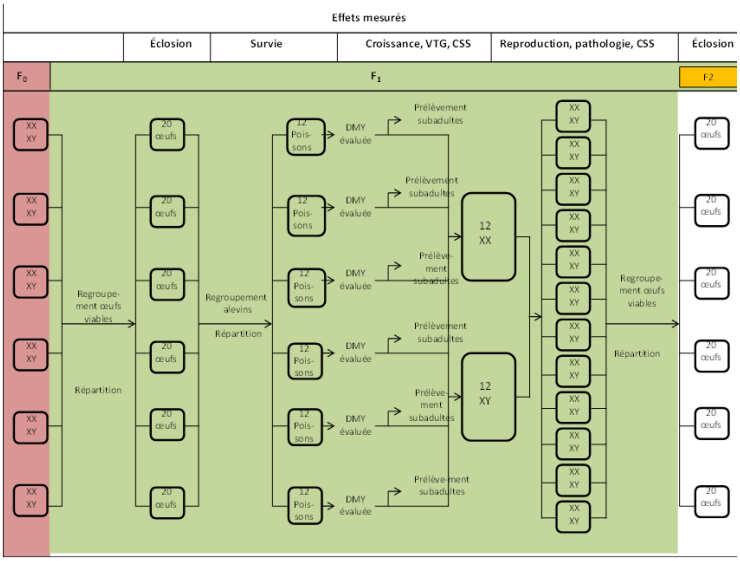
▼M8

Appendice 7

SCHÉMA DU REGROUPEMENT ET DE LA RÉPARTITION DES RÉPLICATS DU DÉBUT À LA FIN DE LA MÉTHODE D'ESSAI MEOGRT

Figure 1

Regroupement et répartition des réplicats du début à la fin de l'essai MEOGRT. Ce graphique représente un traitement, ou la moitié d'un groupe témoin. Du fait des regroupements, l'identité des réplicats n'est pas continue du début à la fin de l'essai. Le terme «œufs» désigne les œufs viables fécondés (équivaut à embryons)



Traitements et réplication

Cette méthode d'essai recommande cinq traitements par le produit chimique d'essai (produit de qualité technique) et un témoin négatif. Le nombre de réplicats par traitement n'est pas constant du début à la fin de l'essai MEOGRT, et le nombre de réplicats dans le groupe témoin est deux fois plus élevé que dans chacun des groupes traités. A la génération F0, chaque groupe traité par produit chimique d'essai comprend six réplicats alors que le groupe témoin négatif compte 12 réplicats. Les solvants sont fortement déconseillés; si un solvant est utilisé, cette utilisation et le choix du solvant doivent être justifiés dans le rapport d'essai. En outre, si un solvant est utilisé, deux types de témoins sont nécessaires: a) un témoin avec solvant, et b) un témoin négatif. Ces deux groupes témoins devront comporter chacun tous les réplicats prévus aux différentes étapes du déroulement de l'essai MEOGRT. Cette structure de réplicats reste inchangée tout au long du développement de l'organisme d'essai à la génération F1 (et F2 jusqu'à l'éclosion). Toutefois, au stade adulte, lorsque les couples reproducteurs F1 sont constitués, le nombre de réplicats de couples reproducteurs par traitement est doublé pour un résultat optimal; il y a donc 12 couples réplicats par groupe traité par produit chimique d'essai et 24 couples réplicats dans le groupe témoin (ainsi que 24 couples réplicats dans le groupe témoin solvant, le cas échéant). La détermination de l'éclosion des embryons pondus par les couples F1 se fait sur la même structure de réplicats que pour les embryons pondus par les couples F0, à savoir initialement six réplicats par groupe traité par produit chimique d'essai et 12 réplicats dans le(s) groupe(s) témoin.

▼**M8**

Appendice 8

COMPTAGE DES PAPILLES DE LA NAGEOIRE ANALE

Principaux matériels et réactifs

— Microscope de dissection (avec appareil photo en option)

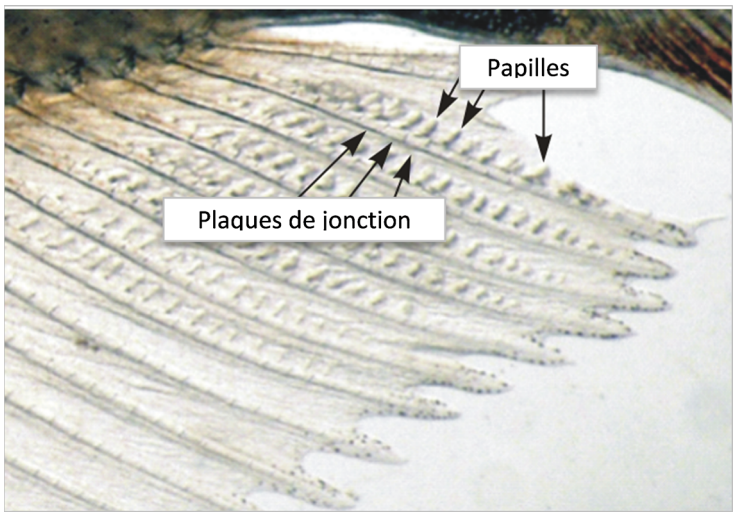
— Fixateur (de Davidson, par exemple (le liquide de Bouin n'est pas recommandé)), si le comptage ne se fait pas par analyse d'image

Procédures

Après nécropsie, il convient d'obtenir une image de la nageoire anale afin de pouvoir commodément compter les papilles de la nageoire anale. Bien que l'imagerie soit la méthode recommandée, la nageoire anale peut être fixée au fixateur de Davidson ou au moyen d'un autre fixateur approprié pendant 1 minute environ. Il est important de maintenir la nageoire à plat pendant la fixation, pour faciliter le comptage ultérieur des papilles. La carcasse avec la nageoire anale peut être conservée dans le fixateur de Davidson ou un autre fixateur approprié jusqu'à l'analyse. Compter le nombre de plaques de jonction (voir la **figure 1**) comportant des papilles faisant saillie au niveau du rebord postérieur de la plaque.

Figure 1

Papilles de la nageoire anale.



▼M8

Appendice 9

CHRONOLOGIE DÉTAILLÉE DE L'ESSAI MEOGRT

Semaines d'essai 1-3 (F0)

Les poissons reproducteurs de la génération F0 qui ont répondu aux critères de sélection (voir les paragraphes 16-20) sont exposés pendant trois semaines afin que les gamètes et tissus gonadiques en développement soient exposés au produit chimique d'essai. Chaque cuve de réplicats contient un seul couple reproducteur (couple femelle XX-mâle XY). Les œufs pondus sont récoltés, comptés et leur fertilité est évaluée pendant 21 jours consécutifs, à partir du 1er jour d'essai.

Semaine d'essai 4 (F0 et F1)

Il est préférable que les œufs fécondés et viables (embryons) soient récoltés sur une seule journée; cependant, s'il n'y a pas suffisamment d'embryons, ils peuvent être récoltés sur deux jours. Dans ce cas, tous les embryons du même traitement qui ont été récoltés le premier jour sont regroupés avec ceux qui sont récoltés le deuxième jour. Puis la totalité des embryons ainsi regroupés pour chaque traitement est répartie de façon aléatoire dans les incubateurs de réplicats à raison de 20 embryons par incubateur. Les décès d'œufs fécondés (embryons) sont consignés quotidiennement. Les œufs morts sont retirés des incubateurs (la mort des œufs fécondés peut être identifiée, en particulier à un stade précoce, d'après une diminution marquée de la transparence et un changement de coloration, dus à la coagulation et/ou la précipitation des protéines, se traduisant par un aspect blanc opaque; OCDE 2010).

Nota: si un seul traitement nécessite un deuxième jour de récolte, tous les traitements (témoins compris) doivent suivre la même procédure. Si, après le second jour de récolte, le nombre d'embryons est insuffisant, au sein d'un traitement, pour qu'il soit possible de charger 20 embryons par incubateur, on réduira à 15 le nombre d'embryons par incubateur pour ce traitement spécifique. S'il n'y a pas assez d'embryons pour en charger 15 par incubateur, on réduira le nombre d'incubateurs réplicats jusqu'à un nombre permettant de charger 15 embryons par incubateur. Il est en outre possible d'augmenter le nombre de couples reproducteurs par traitement et groupe témoin, à la génération F0, afin de produire plus d'œufs et d'atteindre le nombre recommandé de 20 par réplicat.

Au 24e jour d'essai, les couples reproducteurs F0 sont euthanasiés et leurs poids et longueur sont consignés. Il est possible, si nécessaire, de prolonger d'un ou deux jours les couples reproducteurs F0 pour redémarrer la génération F1.

Semaines d'essai 5-6 (F1)

Un ou deux jours avant le début prévisible de l'éclosion, stopper ou réduire l'agitation des œufs en incubation pour accélérer l'éclosion. Des embryons éclosant chaque jour, les alevins sont regroupés par traitement et répartis de façon systématique dans les cuves réplicats destinées aux larves au sein de chaque traitement spécifique, chaque cuve ne devant pas contenir plus de 12 alevins. La répartition se fait de façon aléatoire; on sélectionne des alevins que l'on place un par un dans des réplicats successifs en les choisissant au hasard, et en passant chaque fois dans le même ordre d'un réplicat du traitement considéré au suivant jusqu'à ce que tous les réplicats au sein du traitement comportent 12 alevins. S'il n'y a pas suffisamment d'alevins pour remplir tous les réplicats, veiller à ce que le plus grand nombre de réplicats possible comportent 12 alevins pour le démarrage de la phase F1.

Les œufs qui n'ont pas éclos au terme de deux fois le jour médian de l'éclosion chez les témoins sont considérés comme non viables et écartés. Le nombre d'alevins est consigné et le taux d'éclosion est calculé dans chaque réplicat.

▼M8

Semaines d'essai 7-11 (F1)

La survie des larves est contrôlée et consignée chaque jour dans tous les réplicats. Au 43e jour d'essai, le nombre de poissons survivants dans chaque réplicat est consigné, ainsi que le nombre initial d'alevins placés dans le réplicat (valeur nominale: douze). Cela permet de calculer le taux de survie depuis l'éclosion jusqu'au stade subadulte.

Semaine d'essai 12 (F1)

Au 78e-85e jour, on procède à un petit prélèvement tissulaire sur la nageoire caudale de chaque poisson afin de déterminer le sexe génotypique de chaque individu. Ces données sont utilisées pour constituer les couples reproducteurs.

Dans les trois jours suivant la détermination du sexe génotypique de chaque poisson, 12 couples reproducteurs par traitement et 24 couples par témoin sont constitués de façon aléatoire. Deux poissons XX et XY de chaque réplicat sont sélectionnés de façon aléatoire et regroupés par sexe, puis sélectionnés de façon aléatoire pour constituer les couples reproducteurs (couples XX-XY). Un minimum de 12 réplicats par traitement et un minimum de 24 réplicats pour les témoins sont constitués, avec un couple reproducteur par réplicat. Si un réplicat ne comporte pas deux poissons XX ou deux poissons XY pouvant être regroupés, des poissons du sexe génotypique requis sont prélevés dans d'autres réplicats du même traitement.

Les poissons restants (au maximum 8 poissons par réplicat) sont euthanasiés et prélevés pour la mesure des effets au stade subadulte. Les données relatives au gène *dmy* (XX ou XY) pour tous les prélèvements subadultes sont conservées de telle sorte qu'il soit possible de relier tous les effets mesurés au sexe génétique de chaque individu.

Semaines d'essai 13-14 (F1)

L'exposition se poursuit pendant le passage des couples reproducteurs subadultes au stade adulte. Au 98e jour d'essai (jour précédant le début de la récolte des œufs), les œufs sont retirés des aquariums et prélevés sur les femelles.

Semaines d'essai 15-17 (F1)

Les œufs pondus sont récoltés chaque jour pendant 21 jours consécutifs dans chaque réplicat et la fécondité et la fertilité sont évaluées.

Semaine d'essai 18 (répétition de la semaine d'essai 4) (F1 et F2)

Au 120e jour d'essai, on procède le matin à la récolte des œufs dans chaque réplicat. Les œufs récoltés sont évalués et les œufs fertiles (débarrassés de leurs filaments) de chaque couple reproducteur sont regroupés par traitement et répartis de façon systématique dans les chambres d'incubation à raison de 20 œufs fertiles par incubateur. Les incubateurs peuvent être placés dans des «cuves à incubateurs» séparées pour chaque traitement, ou dans la cuve réplicat qui contiendra les larves écloses, après l'éclosion. Il est préférable que les embryons soient récoltés sur une seule journée; cependant, si leur nombre est insuffisant, ils peuvent être récoltés sur deux jours. Dans ce dernier cas, tous les embryons d'un traitement qui ont été récoltés le premier jour sont regroupés avec ceux qui sont collectés le deuxième jour. Puis la totalité des embryons de chaque traitement est répartie de façon aléatoire dans les incubateurs réplicats, à raison de 20 embryons par incubateur. Nota: si un seul traitement requiert un second jour de collecte,

▼M8

tous les traitements (témoins compris) doivent suivre la même procédure. Si, après le second jour de récolte, il n'y a pas suffisamment d'embryons au sein d'un traitement pour charger 20 embryons par incubateur, on réduira à 15 le nombre d'embryons par incubateur au sein de ce traitement. S'il n'y a pas suffisamment d'embryons pour en charger 15 par incubateur, on réduira le nombre d'incubateurs réplicats jusqu'à ce qu'il soit possible d'avoir 15 embryons par incubateur.

Au 121^{e} jour d'essai (ou au 122^{e} jour, si un délai est nécessaire pour le bon démarrage de F2), les couples reproducteurs F1 sont euthanasiés et analysés (mesure des effets au stade adulte). Il est possible, si nécessaire, de prolonger d'un ou deux jours les couples reproducteurs F1 pour redémarrer la génération F2.

Semaines d'essai 19-20 (F2)

Un ou deux jours avant le début prévisible de l'éclosion, stopper ou réduire l'agitation des œufs en incubation pour accélérer l'éclosion. Si l'essai se termine à l'éclosion de la génération F2, les alevins sont comptés chaque jour puis écartés. (Les embryons qui n'ont pas éclos après une période d'incubation prolongée, définie comme deux fois le jour médian d'éclosion chez les témoins, sont considérés comme non viables).

▼**M8**

Appendice 10

ANALYSE STATISTIQUE

Les types de données biologiques générées lors de l'essai MEOGRT ne sont pas spécifiques de cet essai et, sauf pour les données de pathologie, de nombreuses méthodes statistiques ont été mises au point qui permettent d'analyser correctement ces données selon leurs caractéristiques (normalité, homogénéité des variances, notamment) et selon que les modalités de l'étude se prêtent ou non à la vérification d'hypothèses ou à l'analyse de régression, à des tests paramétriques ou non paramétriques, etc. En règle générale, les analyses statistiques suggérées sont conformes aux recommandations de l'OCDE pour les données d'écotoxicité (OCDE 2006) et l'on trouvera à la figure 2 un diagramme décisionnel pour l'analyse des données de l'essai MEOGRT.

On suppose que les jeux de données de l'essai suivent le plus souvent un modèle de réponse monotone. Il faut en outre examiner si un test statistique unilatéral ou bilatéral doit être utilisé. Il est suggéré d'utiliser un test unilatéral sauf si cette solution ne convient pas pour des raisons biologiques. Des tests statistiques précis sont recommandés dans ce qui suit, mais si des méthodes statistiques plus appropriées et/ou plus puissantes sont développées pour être appliquées aux données spécifiques générées lors du MEOGRT, il y a lieu de les utiliser pour bénéficier des avantages qu'elles présentent.

Les données de l'essai MEOGRT doivent être analysées séparément pour chaque sexe génotypique. Deux stratégies sont envisageables pour analyser les données relatives aux poissons présentant une inversion sexuelle (mâles XX ou femelles XY): 1) censurer toutes les données relatives aux poissons présentant une inversion sur l'ensemble de l'essai, sauf pour ce qui est de la prévalence de l'inversion dans chaque réplicat; 2) conserver les données relatives aux poissons présentant une inversion et procéder à l'analyse sur la base du sexe génotypique.

Données histopathologiques

Les données histopathologiques sont consignées sous la forme d'indices de gravité, qui sont évalués par une procédure statistique de conception récente, le Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS) (Green *et al.*, 2014). L'ajustement *Rao-Scott* permet de tenir compte des réplicats; la procédure *by Slices* intègre l'augmentation attendue des indices de gravité lorsque les concentrations d'exposition augmentent. Pour chaque diagnostic, les résultats du RSCABS indiquent quels traitements induisent une prévalence de pathologie accrue par rapport aux témoins et le degré de gravité correspondant.

Données relatives à la fécondité

Les données de fécondité sont analysées selon une procédure descendante (test de Jonckheere-Terpstra ou de Williams) visant à déterminer les effets des traitements, à condition que les données soient compatibles avec une relation concentration-réponse monotone. La procédure descendante permet de faire des comparaisons à un niveau de significativité de 0,05 en évitant les ajustements liés au nombre de comparaisons effectuées. Des données compatibles avec une relation concentration-réponse monotone sont attendues, mais ce point peut être vérifié soit en procédant à un examen visuel des données soit en construisant les contrastes linéaires et quadratiques des moyennes par traitement après hiérarchisation des données. Sauf si le contraste quadratique est significatif alors que le contraste linéaire ne l'est pas, le test de tendance est réalisé. Sinon, le test de Dunnett est utilisé pour déterminer les effets des traitements si les données présentent une distribution normale et des variances homogènes. Si ces conditions ne sont pas remplies, on utilise le test de Dunn avec l'ajustement de Bonferroni-Holm. Tous les tests indiqués sont réalisés indépendamment de tout test global F ou de Kruskal-Wallis. On trouvera dans OCDE 2006 plus de précisions sur ces différents tests.

▼M8

D'autres méthodes peuvent être utilisées, par exemple un modèle linéaire généralisé avec erreurs de Poisson pour le décompte des œufs (sans transformation), dès lors que cela est justifié du point de vue statistique (Cameron et Trividi, 2013). Dans ce cas, il est recommandé de faire appel à un spécialiste en statistique.

Comptage quotidien des œufs sur une seule génération

Le modèle ANOVA est donné par Y=temps*temps+traitement + *traitement + temps*traitement + *temps*traitement, avec les effets aléatoires de réplicat (génération*traitement) et temps*réplicat(traitement), autorisant des composantes de variances inégales des deux types sur plusieurs générations. Le terme «temps» fait référence à la fréquence de comptage des œufs (jour ou semaine, par exemple). Il s'agit d'une analyse sur mesures répétées: les corrélations entre observations sur les mêmes réplicats rendent compte de la nature des données en tant que mesures répétées.

Les principaux effets des traitements sont soumis au test de Dunnett (ou Dunnett-Hsu), qui permet d'ajuster le nombre de comparaisons. Ces ajustements sont nécessaires pour la génération et le temps, car aucun de ces deux facteurs n'est associé à niveau «témoin» et chaque paire de niveaux est potentiellement intéressante à comparer. Dans les deux cas, si le test F pour le principal effet est significatif au niveau 0,05, les comparaisons par paires inter-niveaux de ce facteur peuvent être testées au niveau 0,05 sans ajustement supplémentaire.

Le modèle inclut des interactions à deux ou trois facteurs, si bien qu'un effet principal pour le temps, par exemple, peut ne pas être significatif, même si le temps a un impact significatif sur les résultats. Si une interaction à deux ou trois facteurs faisant intervenir le temps est significative au niveau 0,05, on peut donc accepter les comparaisons de niveaux de temps au niveau de significativité 0,05 sans ajustement supplémentaire.

Viennent ensuite les tests F pour la significativité du traitement dans le temps, c'est-à-dire les «tranches» (*slices*) du tableau ANOVA. Si, par exemple, la tranche correspondant au traitement appliqué à la génération F1 et au temps 12 est significative au niveau 0,05, les comparaisons par paires des traitements appliqués à la génération F1 et au temps 12 peuvent être acceptées au niveau 0,05 sans ajustement supplémentaire. Des règles similaires s'appliquent aux tests relatifs au temps dans la génération F1 au sein d'un traitement, ou à la génération associée à un temps et à un traitement donnés.

Enfin, pour les comparaisons ne relevant d'aucune des catégories ci-dessus, les comparaisons doivent être ajustées suivant la méthode d'ajustement des valeurs p de Bonferroni-Holm. On trouvera plus de précisions sur les analyses de ce type chez Hocking (1985) et Hochberg et Tamhane (1987).

Une autre méthode consiste à relever les données brutes et à les présenter dans le rapport comme la fécondité (nombre d'œufs) par réplicat pour chaque jour. La moyenne des données brutes par réplicat est calculée et une transformation racine carrée est appliquée. Une ANOVA à un critère est appliquée aux moyennes transformées par réplicat, suivie des contrastes de Dunnett. Il peut également être intéressant d'examiner visuellement les données de fécondité de chaque traitement et/ou réplicat à partir d'un nuage de points représentant la distribution des données dans le temps. Cette méthode permettra une évaluation informelle des effets potentiels dans le temps.

Analyse de toutes les autres données biologiques

Les analyses statistiques sont fondées sur l'hypothèse que si les doses ont été correctement sélectionnées, les données seront monotones. Leur monotonie est donc établie formellement d'après les contrastes linéaires et quadratiques. Si les données sont monotones, il est recommandé de procéder à un test de tendance de Jonckheere-Terpstra sur les médianes des réplicats (conseillé dans OCDE 2006). Si le contraste quadratique est significatif mais que le contraste linéaire ne l'est pas, les données sont considérées comme non monotones.

▼M8

Si les données sont non monotones, en particulier du fait d'une réponse réduite pour le traitement le plus élevé ou les deux traitements les plus élevés, il faut envisager de censurer le jeu de données considéré et de procéder à l'analyse sans ces traitements. Cette décision nécessite un avis d'expert et doit être fondée sur toutes les données disponibles, en particulier celles qui indiquent une toxicité manifeste à ces niveaux de traitement.

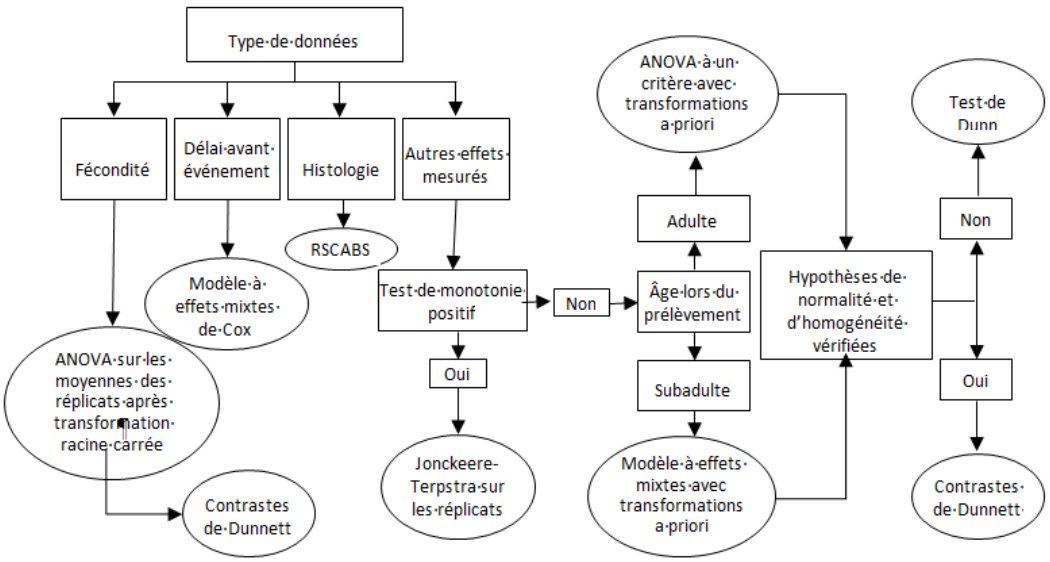
Pour le poids et la longueur, il n'est pas recommandé de transformer les données, bien que cela puisse occasionnellement être nécessaire. En revanche, une transformation logarithmique est recommandée pour les données relatives à la vitellogénine; une transformation racine carrée est recommandée pour les données relatives aux CSS (papilles de la nageoire anale); une transformation arc sinus racine carrée est recommandée pour les données relatives au taux d'éclosion, au taux de survie, au sex-ratio et au pourcentage d'œufs fertiles. Le délai avant éclosion et le délai avant la première ponte doivent être traités comme des données de type «délai avant événement»: les embryons n'éclosant pas pendant la période fixée ou les réplicats ne pondant jamais sont traités comme des données censurées à droite. Le délai avant éclosion doit être calculé à partir du jour médian d'éclosion de chaque réplicat. Ces effets mesurés sont analysés à l'aide d'un modèle des risques proportionnels de Cox pour des effets mixtes.

Les données biologiques relatives aux adultes prélevés ne sont mesurées qu'une fois par réplicat; en effet, il y a un poisson XX et un poisson XY par aquarium réplicat. Il est donc recommandé de procéder à une ANOVA à un critère sur les moyennes des réplicats. Si les hypothèses de l'ANOVA (normalité et homogénéité des variances telles qu'évaluées sur les résidus de l'ANOVA par le test de Shapiro-Wilk et le test de Levene, respectivement) sont vérifiées, les contrastes de Dunnett doivent être utilisés pour déterminer les traitements qui diffèrent du témoin. En revanche, si les hypothèses de l'ANOVA ne sont pas vérifiées, un test de Dunn doit être pratiqué afin de déterminer quels sont les traitements qui diffèrent du témoin. Une procédure similaire est recommandée pour les données qui prennent la forme de pourcentages (fertilité, éclosion et survie).

Les données biologiques de tous les prélèvements subadultes comportent 1 à 8 mesures par réplicat, ce qui signifie qu'il peut y avoir un nombre variable d'individus contribuant à la moyenne du réplicat pour chaque sexe génotypique. Il est donc recommandé d'utiliser un modèle d'ANOVA à effets mixtes, suivi du test des contrastes de Dunnett, si les hypothèses de normalité et d'homogénéité des variances sont vérifiées (sur les résidus de l'ANOVA à effets mixtes). Si elles ne sont pas vérifiées, un test de Dunn doit être pratiqué afin de déterminer quels sont les traitements qui diffèrent du témoin.

Figure 2

Logigramme des procédures statistiques recommandées pour l'analyse des données de l'essai MEOGRT



▼**M8**

BIBLIOGRAPHIE

(1) OCDE (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (Les annexes de cette publication constituent un document à part), Publications de l'OCDE, , Paris.

(2) Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

(3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/ Cole.

(4) Hochberg Y and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

▼M8

C.53. ESSAI DE CROISSANCE ET DE DÉVELOPPEMENT DE LARVES D'AMPHIBIENS (LAGDA)

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice (LD) 241 (2015) de l'OCDE. Le développement et la validation d'un essai capable de détecter et de caractériser les conséquences néfastes de l'exposition à des produits chimiques toxiques chez les amphibiens sont devenus nécessaires du fait des inquiétudes relatives à la présence dans l'environnement de produits chimiques dans des teneurs susceptibles de provoquer des effets néfastes sur les humains et la faune. La ligne directrice de l'OCDE pour l'essai de croissance et de développement de larves d'amphibiens (LAGDA) décrit un essai de toxicité mené sur une espèce d'amphibiens; cet essai (d'une durée de 16 semaines, en général) consiste à étudier la croissance et le développement des amphibiens depuis la fécondation jusqu'à la période juvénile précoce. Il permet d'évaluer le développement initial, la métamorphose, la survie, la croissance et la maturation partielle du système reproducteur. Il permet également de mesurer une série d'autres effets observés en vue d'une évaluation diagnostique des produits chimiques suspectés d'être des perturbateurs endocriniens, ou d'autres types de substances ayant des effets toxiques sur le développement et la reproduction. La méthode décrite ici est inspirée des travaux de validation menés sur le xénope lisse (*Xenopus laevis*) par l'Agence pour la protection de l'environnement des États-Unis (U.S. EPA) avec l'aide du Japon (1). D'autres espèces d'amphibiens peuvent convenir à un protocole d'essai sur la croissance et le développement à même de déterminer si le sexe génétique est un élément important, mais les méthodes et effets observés spécifiques décrits dans la présente méthode d'essai s'appliquent exclusivement à *Xenopus laevis*.

2. Le LAGDA est utilisé comme essai de niveau supérieur sur amphibien pour recueillir des informations plus complètes sur les relations concentration-réponse induisant des effets néfastes, informations qui servent ensuite pour l'identification et la caractérisation des dangers ainsi que pour l'évaluation du risque écologique. Le présent essai se positionne au niveau 4 du Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens, sachant que les essais *in vivo* fournissent également des données sur les effets néfastes basées sur les effets mesurés pertinents du système endocrinien (2). Le plan expérimental général comprend l'exposition d'embryons de *X. laevis* au stade de développement 8-10 d'après Nieuwkoop et Faber (NF) (3) à un minimum de quatre concentrations différentes du produit chimique d'essai (généralement espacées par des intervalles définis selon une progression semi-logarithmique) et un/des témoin(s) jusqu'à 10 semaines après le délai médian jusqu'au stade NF62 dans le témoin, avec un sous-échantillon provisoire au stade NF62 (≤ 45 jours post-fécondation; habituellement autour de 45 jpf). Chaque concentration d'essai est testée sur quatre réplicats, avec huit réplicats pour le témoin. Les effets observés évalués au cours de l'exposition (dans le sous-échantillon provisoire et l'échantillon final à l'achèvement de l'essai) sont ceux qui constituent des indicateurs de toxicité générale, à savoir mortalité, comportement anormal et déterminants de la croissance (longueur et poids), ainsi que ceux conçus pour caractériser les mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens ciblant les processus physiologiques faisant intervenir les œstrogènes, les androgènes et la thyroïde. La méthode décrite vise principalement à mettre en évidence des effets potentiels pertinents au niveau d'une population (à savoir des impacts indésirables sur la survie, le développement, la croissance et le développement du système reproducteur) afin de calculer une concentration sans effet observé (CSEO) ou une concentration efficace à × % (CEx) sur l'effet observé. Il convient de noter que les approches de type CEx sont rarement adaptées aux études de grande ampleur de ce type, où l'augmentation du nombre de concentrations d'essai en vue de déterminer la CEx souhaitée peut être impraticable. Il convient également de noter que cette méthode ne couvre pas la phase de reproduction proprement dite. Les définitions utilisées dans cette méthode d'essai sont données à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

3. Étant donné le nombre limité de produits chimiques testés et le nombre limité de laboratoires impliqués dans l'étude de validation de cette méthode d'essai complexe, on peut s'attendre à ce que la ligne directrice

▼M8

241 de l'OCDE soit réexaminée et si nécessaire mise à jour à la lumière de l'expérience acquise, et quand un nombre suffisant d'études sera disponible pour s'assurer de l'impact de cette méthode d'essai. Le LAGDA est un essai important qui permet d'étudier les facteurs pouvant contribuer à un déclin de la population d'amphibiens en évaluant les effets de l'exposition à des produits chimiques durant le stade larvaire, où les effets sur la survie et le développement, y compris le développement normal des organes reproducteurs, peuvent avoir des répercussions dommageables sur les populations.

4. Le test est conçu pour détecter des effets apicaux résultant de mécanismes endocriniens et non endocriniens, et comprend des paramètres diagnostiques mesurés qui sont, en partie, spécifiques aux principaux mécanismes endocriniens. Il convient de noter que, jusqu'à ce que le LAGDA soit développé, il n'existait aucun essai validé remplissant cette fonction pour les amphibiens.

5. Avant de commencer l'essai, il est important de disposer d'informations sur les propriétés physico-chimiques du produit chimique d'essai, notamment pour pouvoir produire des solutions chimiques stables. Il est également nécessaire de disposer une méthode d'analyse suffisamment sensible pour pouvoir vérifier les concentrations du produit chimique d'essai. L'essai dure 16 semaines environ et nécessite au total 480 animaux, à savoir des embryons de *X. laevis*, (ou 640 embryons en cas d'utilisation d'un témoin avec solvant) afin que l'essai soit suffisamment puissant pour évaluer les effets observés au niveau de la population (croissance, développement et maturation du système reproducteur, par exemple).

6. Avant d'utiliser la méthode d'essai pour tester un mélange à des fins réglementaires, il convient de vérifier si les résultats seront acceptables dans le cadre réglementaire imposé. En outre, cet essai n'évalue pas directement la fécondité, de sorte qu'il peut ne pas être applicable pour une utilisation à un stade plus avancé que le niveau 4 du Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens.

FONDEMENT SCIENTIFIQUE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

7. Une grande partie des connaissances dont nous disposons sur la biologie des amphibiens ont été obtenues à l'aide de l'espèce de laboratoire modèle *X. laevis*. Cette espèce peut être cultivée en routine au laboratoire, l'ovulation peut être induite par l'emploi de gonadotrophine chorionique humaine (hCG), et il est possible de se procurer facilement des animaux auprès des fournisseurs commerciaux.

8. Comme chez tous les vertébrés, la reproduction des amphibiens est contrôlée par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG) (4). Les œstrogènes et les androgènes sont des médiateurs de ce système endocrinien; ils contrôlent le développement et la physiologie des tissus sexuellement dimorphiques. Le cycle de vie des amphibiens se décompose en trois phases successives durant lesquelles cet axe est particulièrement actif: (1) la différenciation gonadique pendant le développement larvaire, (2) le développement des caractères sexuels secondaires et la maturation des gonades pendant la phase juvénile et (3) la reproduction fonctionnelle des adultes. À chacune de ces trois phases de développement, le système endocrinien est susceptible d'être perturbé par certains produits chimiques (œstrogènes et androgènes, par exemple), ce qui finira par entraîner une diminution de la capacité de reproduction des organismes.

9. Les gonades commencent à se développer au stade NF 43 d'après Nieuwkoop et Faber, au moment de la formation de la crête génitale bipotentielle. La différenciation des gonades commence au stade NF 52 lorsque les cellules germinales primordiales migrent vers le tissu médullaire (mâles)

▼M8

ou bien restent dans la région corticale (femelles) des gonades en développement (3). Ce processus de différenciation sexuelle des gonades a été signalé pour la première fois comme sensible à l'action des produits chimiques chez *Xenopus laevis* dans les années 1950 (5) (6). L'exposition de têtards à l'œstradiol durant cette période de différenciation gonadique provoque un changement de sexe chez les mâles, qui deviennent des femelles pleinement fonctionnelles une fois parvenus à l'âge adulte (7) (8). L'inversion fonctionnelle du sexe des femelles en mâles est également possible et a été rapportée après l'implantation de tissu testiculaire sur des têtards (9). Cependant, si l'exposition à un inhibiteur de l'aromatase entraîne égalementun changement de sexe fonctionnel chez *X. tropicalis* (10), cet effet n'a pas été constaté chez *X. laevis*. Historiquement, les effets de produits toxiques sur la différenciation gonadique étaient évalués par l'examen histologique des gonades au moment de la métamorphose, et le changement de sexe ne pouvait être déterminé que par l'analyse des sex-ratios génotypiques/phénotypiques. Jusqu'à une date récente, il n'existait aucun moyen de déterminer directement le sexe génétique de *Xenopus*. Cependant, la création récente de marqueurs sexuels chez *X. laevis* permet de déterminer le sexe génétique et d'identifier directement les animaux dont le sexe a changé (11).

10. Les mâles juvéniles se développent au fur et à mesure de l'augmentation des taux sanguins de testostérone correspondant au développement des caractères sexuels secondaires et des testicules. Chez les femelles, l'œstradiol est produit par les ovaires, ce qui entraîne l'apparition de vitellogénine (VTG) dans le plasma et d'ovocytes vitellogéniques dans l'ovaire, ainsi que le développement des oviductes (12). Les oviductes sont des caractères sexuels secondaires féminins qui interviennent dans la maturation des ovocytes pendant la reproduction. Les ovocytes s'entourent d'une gangue gélatineuse lorsqu'ils transitent par l'oviducte et s'accumulent dans l'ovisac, prêts à être fécondés. Le développement de l'oviducte semble être régulé par les œstrogènes, puisqu'il est corrélé aux taux sanguins d'œstradiol chez *X. laevis* (13) et *X. tropicalis* (12). Le développement d'oviductes chez les mâles exposés à des biphényles polychlorés (14) et au 4-*tert*-octylphénol (15) a été signalé.

PRINCIPE DE L'ESSAI

11. La conception de l'essai implique d'exposer par voie aquatique des embryons de *X. laevis* au stade NF 8-10 à quatre concentrations différentes du produit chimique d'essai et un/des témoin(s) jusqu'à 10 semaines après le délai médian jusqu'au stade NF62 dans le témoin, avec un sous-échantillon intermédiaire au stade NF62. S'il est aussi envisageable d'administrer des produits chimiques hautement hydrophobes via l'alimentation, cette voie d'exposition n'a guère été explorée dans cet essai jusqu'à présent. Chaque concentration d'essai est testée sur quatre réplicats, avec huit réplicats pour chaque témoin. Les effets observés évalués au cours de l'exposition sont ceux qui constituent des indicateurs de toxicité générale (mortalité, comportement anormal et déterminants de la croissance (longueur et poids)) ainsi que ceux conçus pour caractériser les mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens ciblant les processus physiologiques faisant intervenir les œstrogènes, les androgènes et la thyroïde (histopathologie de la thyroïde, histopathologie des gonades et du conduit gonadique, développement anormal, vitellogénine plasmatique (optionnel) et sex-ratios génotypiques/phénotypiques).

CRITÈRES DE VALIDITÉ DE L'ESSAI

12. Les critères suivants s'appliquent pour la validité de l'essai:

— La concentration d'oxygène dissous est ≥ 40 % de la valeur de saturation en air tout au long de l'essai;

▼**M8**

— La température de l'eau est de 21 ± 1 °C et les différentiels inter-réplicat et inter-traitement n'excèdent pas 1,0 °C;

— Le pH de la solution d'essai demeure entre 6,5 et 8,5, et les différentiels inter-réplicat et inter-traitement n'excèdent pas 0,5;

— Les données disponibles démontrent que la concentration du produit chimique d'essai en solution a été correctement maintenue dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées;

— La mortalité au cours de la période d'exposition est ≤ 20 % dans chaque réplicat en ce qui concerne les témoins;

— La viabilité est ≥ 70 % dans le frai choisi pour commencer l'étude;

— Le délai médian jusqu'au stade NF62 dans le témoin est ≤ 45 jours;

— Le poids moyen des organismes d'essai au stade NF62 et à la fin de l'essai dans les témoins et les témoins avec solvant (si un solvant est utilisé) atteint 1,0 ± 0,2 et 11,5 ± 3 g, respectivement.

13. Bien qu'il ne s'agisse pas d'un critère de validité, il est recommandé de disposer pour l'analyse d'au moins trois niveaux de traitement avec trois réplicats non compromis. Une mortalité excessive, ce qui compromet un traitement, est définie comme plus de 4 décès (> 20 %) ne pouvant pas s'expliquer par une erreur technique dans au moins deux réplicats. Au moins trois niveaux de traitement exempts de toxicité manifeste sont nécessaires pour effectuer les analyses. Les signes de toxicité manifeste peuvent comprendre, sans s'y limiter, des animaux flottant à la surface, immobiles au fond du vivier, une nage inversée ou irrégulière, un manque d'activité à la surface et l'absence de réponse au stimulus, des anomalies morphologiques (difformité des membres, par exemple), des lésions hémorragiques et des œdèmes abdominaux.

14. Si un écart par rapport aux critères de validité de l'essai est observé, les conséquences doivent être appréciées au regard de la fiabilité des résultats de l'essai et ces écarts et leur appréciation doivent être consignés dans le rapport d'essai.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

15. On utilise du matériel courant de laboratoire et en particulier:

(a) appareil de contrôle de la température (dispositifs de chauffage et de refroidissement réglables à 21 ± 1 °C, par exemple);

▼M8

(b) thermomètre;

(c) microscope binoculaire à dissection et instruments de dissection;

(d) caméra numérique dotée d'une résolution minimale de 4 mégapixels et d'une fonction micro (si nécessaire);

(e) balance analytique d'une précision de 0,001 mg ou 1 µg;

(f) appareil de mesure de l'oxygène dissous et pH-mètre;

(g) appareil de mesure de l'intensité lumineuse capable de fournir des résultats en lux.

Eau

Source et qualité

16. Toute eau de dilution disponible localement (eau de source ou eau du robinet filtrée sur charbon, par exemple) et permettant la croissance et le développement normaux de *X. laevis* peut être employée, et des informations concrètes attestant de cette capacité doivent être disponibles. Dans la mesure où la qualité de l'eau est susceptible de varier de façon importante d'une zone à l'autre, elle est évaluée, en particulier en l'absence de données historiques concernant l'usage de cette eau pour élever des larves d'amphibiens. Le dosage des métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, par exemple), des principaux anions et cations (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}, par exemple), des pesticides, du carbone organique total et des solides en suspension doit être effectué avant le lancement de l'essai et/ou tous les six mois, par exemple, pour une eau de dilution connue pour être de qualité relativement constante. Certaines caractéristiques chimiques pour une eau de dilution acceptable sont énumérées à l'appendice 2.

Concentration d'iode dans l'eau employée pour l'essai

17. Pour que la glande thyroïde puisse synthétiser les hormones qui favoriseront une métamorphose normale, les larves doivent disposer de quantités suffisantes d'iode, provenant d'une combinaison de sources aqueuses et alimentaires. Il n'existe aujourd'hui aucune recommandation d'origine empirique concernant les concentrations d'iode minimales dans la nourriture ou l'eau nécessaires pour assurer un bon développement. Cependant, la disponibilité de l'iode est susceptible d'affecter la capacité de réponse du système thyroïdien aux agents actifs sur la thyroïde, un facteur par ailleurs connu pour influencer l'activité basale de cette glande: ce point mérite d'être pris en compte lors de l'interprétation des résultats d'histopathologie de la thyroïde. D'après des travaux précédents, la réussite de l'essai a été démontrée lorsque les concentrations d'iode dans l'eau de dilution (I^{-}) sont comprises entre 0,5 et 10 µg/l. Idéalement, la concentration minimale d'iode dans l'eau de dilution au cours de l'essai doit être de 0,5 µg/l (ajouté sous forme de sodium ou de sel de potassium). Lorsque l'essai est mené avec de l'eau désionisée, un supplément d'iode est nécessaire afin d'atteindre cette concentration minimale de 0,5 µg/l. Les concentrations mesurées d'iode dans l'eau de l'essai (eau de dilution) et l'ajout d'iode ou d'autres sels (en cas d'utilisation) à l'eau de l'essai sont notifiés dans le rapport. La teneur en iode peut aussi être mesurée dans la nourriture, en plus de l'eau de l'essai.

Système d'exposition

18. L'essai a été développé en utilisant un système de dilution dynamique est employé pour cet essai. Les composants du système sont constitués d'un matériau adapté au contact avec l'eau, comme le verre, l'acier inoxydable ou d'autres matériaux chimiquement inertes. Les viviers d'exposition sont constitués d'aquariums de verre ou d'acier inoxydable, le volume utilisable étant compris entre 4,0 et 10,0 l (profondeur minimum de l'eau de 10 à 15 cm). Le système doit être capable de prendre en charge l'ensemble des concentrations d'exposition, un témoin seul et un témoin avec solvant, si nécessaire, chaque concentration d'essai étant testée sur quatre réplicats, avec huit réplicats pour les témoins. La vitesse d'écoulement de chaque récipient est constante afin de garantir la stabilité des conditions biologiques et de

▼M8

l'exposition chimique. Il est recommandé de maintenir dans les viviers un débit approprié (minimum cinq renouvellements par jour, par exemple) afin d'éviter une baisse de la concentration de produit chimique du fait du métabolisme des organismes d'essai et des microorganismes aquatiques présents dans les aquariums, des voies de dégradation abiotiques (hydrolyse, photolyse) ou de la dissipation (volatilisation, sorption). Les viviers sont disposés de manière aléatoire au sein du système d'exposition, de manière à amoindrir les effets éventuellement liés à la position, notamment de légères variations de température, d'intensité lumineuse, etc. On trouvera des informations complémentaires concernant la mise en place de systèmes d'exposition dynamiques dans le guide de l'ASTM intitulé *Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians* (16).

Introduction des produits chimiques: préparation des solutions d'essai

19. Pour préparer les solutions d'essai dans le système d'exposition, il convient d'introduire dans le système une solution-mère du produit chimique d'essai à l'aide d'une pompe appropriée ou d'un autre appareil. Le débit de la solution-mère doit être calibré d'après les données analytiques relatives aux solutions d'essai établies avant le début de l'exposition, et faire l'objet d'un contrôle volumétrique périodique au cours de l'essai. La solution d'essai de chaque vivier doit être renouvelée à raison de cinq renouvellements en volume/jour au minimum.

20. La méthode employée pour introduire le produit chimique d'essai dans le système varie en fonction des propriétés physico-chimiques du produit concerné. Par conséquent, avant la mise en œuvre de ce protocole, il convient de collecter les informations de référence sur le produit chimique en question pour déterminer sa testabilité. En ce qui concerne les propriétés du produit chimique d'essai, les informations suivantes sont utiles: formule structurale, poids moléculaire, pureté, stabilité dans l'eau et à la lumière, pKa et Ko/e, hydrosolubilité (de préférence dans le milieu d'essai) et pression de vapeur, ainsi que résultats d'un essai de biodégradabilité facile [méthode d'essai C.4 (17) ou C.29 (18)]. On peut utiliser la solubilité et la pression de vapeur pour calculer la constante de Henry, qui indique les risques de perte par évaporation du produit chimique d'essai. La conduite de cet essai sans les informations énumérées ci-dessus doit être envisagée avec prudence sachant que la conception de l'essai sera fonction des propriétés physico-chimiques du produit chimique d'essai et que, sans ces données, les résultats de l'essai peuvent se révéler difficiles à interpréter voire dénués de sens. Pour déterminer la concentration du produit chimique d'essai dans les solutions d'essai, il convient d'appliquer une méthode d'analyse fiable, dont la précision et la limite de détection sont connues et mentionnées dans le rapport. Les composés hydrosolubles peuvent être mis en solution en aliquotes dans l'eau utilisée pour l'essai à des concentrations aboutissant à la teneur voulue dans le cadre d'une introduction au moyen d'un système dynamique. Les produits chimiques qui sont liquides ou solides à température ambiante et modérément hydrosolubles peuvent nécessiter des saturateurs liquide: liquide ou liquide:solide (colonne de laine de verre, par exemple) (19). Même s'il est également possible d'administrer des substances d'essai très hydrophobes par le biais de l'alimentation, cette voie d'exposition n'a guère été explorée jusqu'à présent dans cet essai.

21. Les solutions testées de concentrations choisies sont préparées par dilution d'une solution mère. La solution mère est préparée de préférence en mélangeant simplement ou en agitant le produit chimique d'essai dans de l'eau de dilution par des moyens mécaniques (e.g. par agitation ou par ultrasons). Des colonnes ou des systèmes de saturation ou des méthodes de dosage passif (20) peuvent être utilisées pour obtenir une solution mère suffisamment concentrée. Les systèmes dépourvus de véhicules sont préférables; cependant les différents produits chimiques testés possèdent des propriétés physico-chimiques variables, qui réclament des approches diverses pour la préparation des solutions aqueuses servant à l'exposition chimique. On s'efforcera dans toute la mesure du possible d'éviter l'emploi de solvants et

▼M8

autres véhicules car: (1) certains solvants peuvent avoir eux-mêmes des effets toxiques et/ou induire des réponses indésirables ou inattendues, (2) l'essai de produits chimiques à une concentration supérieure à leur solubilité dans l'eau (ce qui arrive fréquemment si des solvants sont utilisés) peut fausser la détermination des concentrations efficaces, (3) le recours aux solvants dans les essais à long terme peut se traduire par la formation importante de biofilms associés à une activité microbienne, ce qui peut influer sur les conditions environnementales et sur la capacité de maintenir les concentrations d'exposition, (4) en l'absence de données historiques démontrant que le solvant n'influe pas sur les résultats de l'étude, l'usage de solvants nécessite le traitement d'un groupe témoin avec solvant, ce qui a des effets significatifs en termes de bien-être animal, des animaux supplémentaires étant alors nécessaires pour la conduite de l'essai. Pour les produits chimiques difficiles à tester, un solvant peut être employé en dernier ressort, et l'on consultera alors le document d'orientation de l'OCDE sur les essais de toxicité aquatique des substances et mélanges «difficiles» (21) afin de déterminer la meilleure méthode à employer. Le solvant sera choisi en fonction des propriétés chimiques du produit chimique d'essai et de la disponibilité de données des témoins historiques sur le solvant. En l'absence de données historiques, il est nécessaire de déterminer la pertinence du solvant avant de procéder à l'étude définitive. Si le recours à un solvant est inévitable et si une activité microbienne (formation de biofilms) se produit, il est recommandé de noter/consigner dans le rapport la présence de biofilms dans chaque vivier (au moins une fois par semaine) pendant toute la durée de l'essai. Idéalement, la concentration de solvant devra être maintenue constante dans le témoin avec solvant et tous les groupes traités. Si la concentration de solvant n'est pas maintenue constante, c'est la plus forte concentration de solvant dans le traitement d'essai qui sera utilisée dans le témoin avec solvant. Si un solvant est utilisé comme véhicule, les concentrations maximales de solvant ne devront pas dépasser 100 µl/l ou 100 mg/l (21), et il est recommandé de maintenir la concentration de solvant aussi bas que possible (20 µl/l, par exemple) pour éviter que le solvant puisse avoir une incidence sur les effets mesurés (22).

Animaux d'essai

Espèces d'essai

22. L'espèce d'essai *X. laevis* est utilisée, car il s'agit d'une espèce: (1) élevée couramment dans les laboratoires du monde entier, (2) aisément accessible auprès de fournisseurs commerciaux et (3) dont le sexe génétique peut être déterminé.

Soin et reproduction des adultes

23. Les méthodes de soin et de reproduction adaptées à *X. laevis* sont décrites dans un guide de l'ASTM (23). Les conditions d'encagement de *X. laevis* et les méthodes de soin adaptées à cette espèce sont également décrites par Read (24). Pour provoquer la reproduction, entre trois et cinq paires d'adultes mâles et femelles reçoivent uneinjection intrapéritonéale de gonadotropine chorionique humaine (hCG). La dose injectée aux femelles et aux mâles s'élève respectivement à environ 800 UI – 1 000 UI et 500 UI – 800 UI de hCG dissous dans une solution saline à 0,6 – 0,9 % (ou une solution de Ringer isotonique saline applicable aux amphibiens). Les volumes injectés sont équivalents à environ 10 µl/g de poids corporel (~1 000 µl). Ensuite, les couples de reproducteurs sont placés dans de grands viviers, à l'abri des perturbations et dans des conditions statiques, en vue de stimuler l'amplexus. Chaque vivier de reproduction est équipé d'une grille en acier inoxydable en guise de faux plancher (ouvertures de 1,25 cm, par exemple), permettant aux amas d'œufs de tomber dans un double fond. Si les grenouilles reçoivent une injection de hCG en fin d'après-midi, elles déposent habituellement la majorité de leurs œufs vers le milieu de la matinée suivante. Lorsqu'une quantité suffisante d'œufs ont été libérés et fécondés, il convient de retirer les adultes des viviers de reproduction. Les œufs sont alors collectés, et la gangue gélatineuse est éliminée par traitement à la L-cystéine (23). Une solution de L-cystéine à 2 % est préparée, et le pH est ajusté à 8.1 avec du NaOH 1 M. Cette solution à 21 °C est versée dans un flacon Erlenmeyer de 500 ml contenant les œufs d'un seul frai, brassée délicatement pendant une à deux

▼M8

minutes, puis rincée soigneusement 6 à 8 fois avec de l'eau de culture à 21 °C. Les œufs sont ensuite transférés dans un cristallisoir, et leur viabilité est déterminée: elle doit être > 70 % et les embryons en phase de division cellulaire doivent présenter des anomalies minimes.

CONCEPTION DE L'ESSAI

Concentrations d'essai

24. Il est recommandé d'utiliser un minimum de quatre concentrations du produit chimique d'essai et des témoins appropriés (comprenant, si nécessaire, des témoins avec solvant). En règle générale, il est recommandé d'espacer les concentrations d'un facteur ne dépassant pas 3.2.

25. Pour les besoins de cet essai, on s'appuiera autant que possible sur les résultats d'études existantes sur les amphibiens pour déterminer la concentration d'essai la plus élevée, de manière à éviter des concentrations manifestement toxiques. Les informations fournies, par exemple, par les relations quantitatives structure-activité, les références croisées et les données d'études existantes sur les amphibiens telles que l'essai de métamorphose des amphibiens, la méthode d'essai C.38 (25) et le guide de l'ASTM *Frog Embryo Teratogenesis Assay* - Xenopus (23) et/ou les résultats d'essais sur les poissons [méthodes d'essai C.48, C.41 et C.49] (26) (27) (28) peuvent contribuer à la définition de cette concentration. Avant le lancement du LAGDA, une expérience préliminaire de détermination des gammes de concentration pourra être menée. Il est recommandé de commencer cette expérience dans les 24 heures qui suivent la fécondation et de maintenir l'exposition pendant 7-14 jours (ou plus, si nécessaire), ainsi que de fixer les concentrations d'essai de telle sorte qu'elles soient espacées par un facteur de 10. La gamme de concentrations ainsi obtenue servira à fixer la concentration d'essai maximale dans le LAGDA. On notera que si un solvant doit être utilisé, la pertinence de celui-ci (la question étant de savoir si ce solvant peut influer sur le résultat de l'étude) pourra être déterminée dans le cadre de la détermination de la gamme de concentrations.

Réplicats au sein des groupes traités et des témoins

26. Un minimum de quatre réplicats par concentration d'essai et un minimum de huit réplicats pour les témoins (et le témoin avec solvant, si nécessaire) sont utilisés (ce qui signifie que le nombre de réplicats dans le témoin et l'éventuel témoin avec solvant doit être deux fois supérieur au nombre de réplicats dans chaque groupe traité, pour que l'essai ait une puissance statistique appropriée). Chaque réplicat doit contenir au maximum 20 animaux. Au minimum 15 animaux sont traités (cinq pour le sous-échantillon au stade NF62 et 10 juvéniles). Toutefois, des animaux supplémentaires seront ajoutés dans chaque réplicat pour maintenir le nombre critique de 15 en cas de décès.

PROCÉDURE

Synthèse de l'essai

27. L'essai commence avec des embryons nouvellement frayés (stade NF 8-10) et se poursuit jusqu'au développement des juvéniles. Les animaux sont examinés chaque jour afin de constater d'éventuels décès ou signes de comportement anormal. Au stade NF62, un sous-échantillon de larves (jusqu'à cinq animaux par réplicat) est collecté et la présence de divers effets est recherchée (tableau 1). Une fois que tous les animaux ont atteint le stade NF 66, c'est-à-dire à la fin de leur métamorphose (ou 70 jours après le début de l'essai, selon la première éventualité), une sélection est effectuée

▼M8

au hasard (mais sans sous-échantillonnage) afin de réduire le nombre d'animaux (10 par vivier) (voir paragraphe 43) et l'exposition des animaux restants se poursuit jusqu'à 10 semaines après le délai médian jusqu'au stade NF62 dans le témoin. À la fin de l'essai, les échantillons de juvéniles font l'objet de mesures supplémentaires (tableau 1).

Conditions d'exposition

28. Un résumé complet des paramètres d'essai est présenté à l'appendice 3. Au cours de la période d'exposition, l'oxygène dissous, la température et le pH des solutions d'essai sont mesurés quotidiennement. La conductivité, l'alcalinité et la dureté sont mesurées une fois par mois. En ce qui concerne la température de l'eau des solutions d'essai, les différentiels inter-réplicat et inter-traitement (sur une journée) ne doivent pas dépasser 1,0 °C. De même, en ce qui concerne le pH des solutions d'essai, les différentiels inter-réplicat et inter-traitement ne doivent pas dépasser 0,5.

29. On pourra siphonner quotidiennement les cuves d'exposition pour éliminer les aliments non consommés et des déchets, en veillant à éviter la contamination croisée des cuves. Il convient d'être attentif à stresser et perturber le moins possible les animaux, en particulier pendant les déplacements, le nettoyage des aquariums et la manipulation. Toute activité ou condition stressante devra être évitée, notamment les bruits forts et/ou constants, les vibrations et les coups au niveau des aquariums.

Durée d'exposition au produit chimique d'essai

30. L'exposition commence avec des embryons nouvellement frayés (stade NF 8-10) et se poursuit jusqu'à dix semaines après le délai médian jusqu'au stade NF62 ($\leq$ 45 jours après le lancement de l'essai) dans le groupe témoin. En règle générale, la durée du LAGDA est de 16 semaines (17 semaines maximum).

Lancement de l'essai

31. On aura démontré précédemment que les parents utilisés pour le lancement de l'essai peuvent avoir une descendance génétiquement sexuée (appendice 5). Après le frai des adultes, les embryons sont collectés, traités à la cystéine pour éliminer la gangue gélatineuse et sélectionnés en fonction de leur viabilité (23). Le traitement à la cystéine permet de manipuler les embryons sans que ces derniers collent aux surfaces. La sélection se fait sous un microscope à dissection, en utilisant un compte-gouttes de taille appropriée pour éliminer les embryons non viables. Il est préférable d'utiliser pour l'essai un seul frai donnant une viabilité supérieure à 70 %. Les embryons au stade NF 8-10 sont répartis de façon aléatoire dans les cuves de traitement contenant un volume approprié d'eau de dilution jusqu'à ce que chaque cuve contienne 20 embryons. Il convient de manipuler les embryons avec précaution durant le transfert afin de minimiser leur stress et d'éviter de les blesser. Quatre-vingt-seize (96) heures après la fécondation, les têtards doivent être remontés le long de la colonne d'eau et avoir commencé à s'accrocher aux parois de la cuve.

Régime alimentaire

32. Le régime et la fréquence d'alimentation évoluent en fonction des stades de développement de *X. laevis* et représentent un aspect très important du protocole LAGDA. Ainsi, une alimentation excessive au cours de la phase larvaire se traduit généralement par une augmentation des cas de scoliose et de leur gravité (appendice 8) et doit donc être évitée. À l'inverse, une alimentation insuffisante au cours de la phase larvaire se traduit par des rythmes de développement très variables parmi les témoins, ce qui risque

▼M8

de compromettre la puissance statistique de l'essai ou d'induire des facteurs de confusion pouvant affecter les résultats de l'essai. L'appendice 4 présente le régime alimentaire recommandé pour les larves et les juvéniles de *X. laevis* dans des conditions d'essai dynamique, mais d'autres solutions sont autorisées tant que les organismes d'essai grandissent et se développent de manière satisfaisante. Il importe de noter que s'il s'agit de mesurer les effets sur le système endocrinien, les aliments doivent être exempts de substances actives sur le système endocrinien comme la farine de soja.

Alimentation des larves

33. Le régime alimentaire recommandé pour les larves est constitué de nourriture de départ pour truites, de disques de spiruline et de flocons pour poissons rouges (flocons TetraFin®, Tetra, Allemagne, par exemple) mélangés ensemble dans l'eau de culture (ou de dilution). Ce mélange est administré trois fois par jour en semaine et une fois par jour le week-end. Les têtards sont également nourris avec des nauplii de 24 heures d'artémies vivantes, (*Artemia* spp.), deux fois par jour en semaine et une fois par jour le week-end à compter du huitième jour post-fécondation. L'alimentation des larves, qui doit être conforme dans chaque cuve d'essai, doit permettre la croissance et le développement appropriés des animaux d'essai afin d'assurer la reproductibilité et la transférabilité des résultats d'analyse: (1) le délai médian jusqu'au stade NF62 dans les témoins doit être $\leq$ 45 jours et (2) un poids moyen de 1,0 ± 0,2 g au stade NF62 dans les témoins est recommandé.

Alimentation des juvéniles

34. Une fois la métamorphose achevée, le régime alimentaire se compose de nourriture de premier choix pour amphibiens de type 3/32 pouces (Xenopus Express, FL, États-Unis) (appendice 4). Pour les jeunes grenouilles (juvéniles précoces), broyer brièvement les granulés dans un moulin à café ou un mixeur ou bien écrasés dans un mortier avec un pilon afin de réduire leur taille. Une fois que les juvéniles sont assez grands pour consommer des granulés entiers, le broyage / l'écrasement ne sont plus nécessaires. Les animaux sont nourris une fois par jour. L'alimentation des juvéniles doit permettre la croissance et le développement appropriés des organismes: un poids moyen de 11,5 ± 3 g dans les témoins à la fin de l'essai est recommandé.

Analyse chimique

35. Avant le lancement de l'essai, la stabilité du produit chimique d'essai (sa solubilité, sa dégradabilité et sa volatilité, par exemple) et toutes les méthodes analytiques nécessaires sont établies d'après les données et connaissances existantes, par exemple. En cas d'administration des doses via l'eau de dilution, il est également conseillé d'analyser les solutions d'essai provenant de chaque cuve de réplicat afin de vérifier les performances du système, avant de lancer l'essai. Pendant l'essai, le dosage des concentrations du produit chimique d'essai est effectué à intervalles réguliers, de préférence chaque semaine pour au moins un réplicat au sein de chaque groupe traité, avec une rotation des réplicats au sein du même groupe traité chaque semaine. Il est recommandé de baser les résultats sur les concentrations mesurées. Toutefois, si la concentration du produit chimique d'essai en solution a été correctement maintenue tout au long de l'essai dans un intervalle de ± 20 % autour de la concentration nominale, les résultats peuvent être calculés à partir des valeurs nominales ou mesurées. De même, le coefficient de variation (CV) des concentrations tout au long de l'essai dans un traitement doit être maintenu à 20 % maximum pour chaque concentration. Lorsque les concentrations mesurées ne sont pas maintenues dans un intervalle de 80-120 % de la concentration nominale (si l'essai porte sur des produits chimiques facilement biodégradables ou hautement adsorbants, par exemple), les concentrations avec effet doivent être dosées et exprimées par rapport à la moyenne arithmétique des concentrations dans le cas des essais dynamiques.

▼M8

36. Les débits d'eau de dilution et de solution-mère sont vérifiés à intervalles adéquats (trois fois par semaine, par exemple) pendant toute la durée de l'exposition. Si les produits chimiques se révèlent indétectables à certaines, voire toutes les concentrations nominales, (en raison de leur dégradation rapide ou de leur adsorption dans les cuves d'essai, ou bien d'une accumulation importante de produit chimique dans l'organisme des animaux exposés, par exemple), il est recommandé d'adapter le taux de renouvellement de la solution d'essai dans chaque cuve afin que les concentrations d'essai restent aussi constantes que possible.

Observations et effets mesurés

37. Les effets mesurés au cours de l'exposition correspondent aux indicateurs de toxicité suivants: mortalité, comportement anormal et notamment signes cliniques de maladie et/ou de toxicité générale, et déterminants de la croissance (longueur et poids), ainsi qu'effets pathologiques dus à la fois à une toxicité générale et à des mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens ciblant les processus physiologiques faisant intervenir les œstrogènes, les androgènes et la thyroïde. En outre, la concentration plasmatique de VTG peut être mesurée à la fin de l'essai (optionnel). Le dosage de la VTG peut être utile pour comprendre les résultats de l'étude relatifs aux mécanismes endocriniens des produits chimiques suspectés d'être des perturbateurs endocriniens. Les effets mesurés et le calendrier des mesures sont résumés au tableau 1.

Tableau 1

Vue d'ensemble des effets mesurés lors du LAGDA

Effets mesurés (*)	Quotidiennement	Échantillons intermédiaires (échantillons larvaires)	Fin de l'essai (échantillons de juvéniles)
Mortalité et comportement anormal	X		
Délai jusqu'au stade NF62		X	
Histo(patho)logie (glande thyroïde)		X	
Morphométrie (augmentation du poids et de la longueur)		X	X
Indice hépato-somatique (IHS)			X
Sex-ratios génotypiques/phénotypiques			X
Histopathologie (gonades, conduits reproducteurs, rein et foie)			X
Vitellogénine (VTG) (optionnel)			X

(*) Tous les effets mesurés font l'objet d'une analyse statistique.

Mortalité et observations quotidiennes

38. L'ensemble des viviers est vérifié quotidiennement pour détecter les animaux morts, et les décès survenus dans chaque vivier sont notés dans le rapport. Les animaux morts sont retirés du vivier d'essai dès qu'ils sont identifiés. Leur stade de développement doit être classé comme soit antérieur au stade NF 58 (avant l'apparition des membres antérieurs), soit entre les stades NF 58 et NF 62, soient entre les stades NF 63 et NF 66 (entre le stade NF62 et l'absorption totale de la queue) soit postérieur au stade NF 66 (post-larvaire). Les taux de mortalité supérieurs à 20 % sont des indicateurs potentiels de

▼M8

conditions d'essai mal adaptées, ou d'effets toxiques manifestes du produit chimique d'essai. Les animaux ont tendance à être plus sensibles à des épisodes de mortalité non induite par des produits chimiques au cours des premiers jours de développement qui suivent le frai et pendant le paroxysme métamorphique. Cette mortalité peut apparaître dans les données issues des témoins.

39. En outre, les éventuelles observations de comportement anormal, de malformations visibles (scoliose, par exemple) ou de lésions doivent être notées dans le rapport. Les scolioses observées sont dénombrées (incidence) et classées en fonction de leur indice de gravité (non remarquable – NR, minime – 1, modérée – 2, grave – 3, par exemple; voir appendice 8). On s'efforcera de limiter la prévalence des scolioses modérées et graves (en deçà de 10 % dans les témoins, par exemple) tout au long de l'essai, même si une prévalence accrue d'anomalies dans les témoins n'est pas nécessairement une raison pour arrêter l'essai. Un comportement normal se caractérise par la suspension des larves dans la colonne d'eau, la queue élevée au-dessus de la tête, un battement léger de la queue sur un rythme régulier, des remontées périodiques à la surface, un opercule mobile et la réponse aux stimuli. Inversement, un comportement anormal implique notamment des animaux flottant à la surface, immobiles au fond du vivier, une nage inversée ou irrégulière, un manque d'activité à la surface et l'absence de réponse aux stimuli. En ce qui concerne les animaux postmétamorphiques, outre les comportements anormaux évoqués, les différences de consommation de nourriture entre les groupes traités sont consignées lorsqu'elles sont importantes. Les malformations apparentes et les lésions se manifestent éventuellement par des anomalies morphologiques (difformité des membres, par exemple), des lésions hémorragiques, des œdèmes abdominaux et des infections bactériennes ou fongiques, entre autres. L'apparition de lésions sur la tête des juvéniles, juste derrière les narines, peut être l'indication de taux d'humidité insuffisants. Ces déterminations sont d'ordre qualitatif, et sont considérées comme analogues aux signes cliniques de maladies/stress, et toujours effectuées en comparaison avec les animaux témoins. Un taux d'occurrence supérieur dans les viviers exposés par rapport au groupe témoin constitue la preuve d'une toxicité manifeste.

Sous-échantillons de larves

Description générale de la préparation des sous-échantillons de larves:

40. Les têtards qui ont atteint le stade NF62 sont retirés des viviers puis soit prélevés soit déplacés dans un nouveau vivier pour la suite de l'exposition, ou bien séparés physiquement des têtards restants dans le même vivier avec un diviseur. Les têtards sont vérifiés quotidiennement, et le jour où un individu atteint le stade NF62 est consigné. La caractéristique déterminante dans le cadre de cette évaluation est la forme de la tête. Une fois que la taille de la tête a diminué au point de sembler à peu près de la même largeur que le tronc du têtard et que les membres antérieurs ont atteint le niveau du milieu du cœur, l'individu considéré est consigné comme ayant atteint le stade NF62.

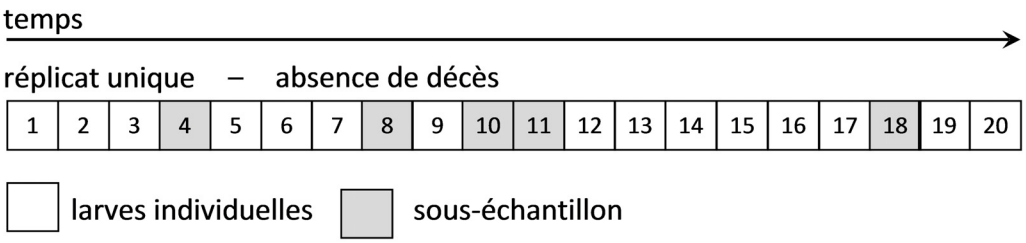
41. L'objectif est de prélever au total cinq têtards au stade NF62 par réplicat. La procédure employée est aléatoire, mais elle est décidée en amont. La **figure 1** illustre un exemple hypothétique de réplicat. Si 20 têtards survivants sont dénombrés dans un vivier particulier lorsque le premier individu atteint le stade NF62, cinq numéros entre 1 et 20 sont choisis au hasard. Le têtard #1 est le premier individu à atteindre le stade NF62 et le têtard #20 est le dernier individu à atteindre le stade NF62 dans le vivier. De même, si 18 larves survivantes sont dénombrées dans un vivier, cinq numéros entre 1 et 18 sont choisis au hasard. La même procédure est suivie pour chaque réplicat lorsque le premier individu atteint le stade NF62. Si des décès sont constatés lors de l'échantillonnage au stade 62, la procédure aléatoire est appliquée de nouveau aux échantillons restants en fonction du nombre de larves restantes

▼**M8**

n'ayant pas atteint le stade NF62 et du nombre d'échantillons supplémentaires nécessaires pour atteindre un total de cinq échantillons à partir de ce réplicat. Le jour où un têtard atteint le stade NF62, on consulte le diagramme d'échantillonnage préparé pour déterminer si cet individu doit être prélevé ou être physiquement séparé des têtards restants pour continuer d'être exposé. Dans l'exemple ci-dessous (**figure 1**), le premier individu à atteindre le stade NF62 (cf. case #1) est physiquement séparé des autres larves, continue d'être exposé, et le jour de l'étude où cet individu a atteint le stade NF62 est noté dans le rapport. Par la suite, les individus #2 et #3 sont traités de la même manière que l'individu #1, puis l'individu #4 est prélevé afin d'observer les déterminants de la croissance et de procéder à un examen histologique de la thyroïde (dans cet exemple). Cette procédure se poursuit jusqu'à ce que le 20^{e} individu rejoigne les individus restants ayant dépassé le stade NF62 ou soit prélevé. La procédure aléatoire employée garantit une même probabilité d'être sélectionné à tous les individus. Pour cela, toute méthode de choix aléatoire est valable, mais chaque têtard doit être comptabilisé à un moment au cours de la période de sous-échantillonnage avant d'atteindre le stade NF62.

Figure 1

Exemple hypothétique d'échantillonnage au stade NF62 dans un réplicat unique



42. Les effets observés sur les sous-échantillons de larves sont les suivants: (1) délai jusqu'au stade NF62 (à savoir, le nombre de jours écoulés entre la fécondation et le stade NF62), (2) anomalies externes, (3) morphométrie (poids et longueur, par exemple) et (4) histologie de la thyroïde.

Euthanasie des têtards

43. Le sous-échantillon de têtards au stade NF62 (cinq individus par réplicat) est euthanasié par immersion pendant 30 minutes dans des quantités appropriées (500 ml, par exemple) de solution anesthésique (solution à 0,3 % de MS-222, méthanesulfonate de tricaïne, CAS.886-86-2, par exemple). La solution de MS-222 doit être tamponnée au bicarbonate de sodium (pH 7,0 environ), car une solution de MS-222 non tamponnée est acide et irritante pour la peau des grenouilles, ce qui entraîne une mauvaise absorption et un stress supplémentaire inutile pour les organismes.

44. Le têtard est retiré de la cuve expérimentale avec une épuisette à filet puis transporté (déposé) dans la solution euthanasique. Après avoir été euthanasié correctement, l'animal est prêt pour la nécropsie lorsqu'il ne réagit plus à des stimuli extérieurs tels que le pincement de la patte arrière avec une paire de forceps.

Morphométrie (poids et longueur)

45. Le poids humide (au mg près) et la longueur museau-cloaque (LMC) (à 0,1 mm près) de chaque têtard sont mesurés dès que le têtard ne répond plus aux stimuli sous l'effet de l'anesthésie (figure 2a). Il est possible d'utiliser un logiciel d'analyse d'images pour mesurer la LMC à partir d'une photographie. Les têtards sont séchés par tamponnage avant la pesée afin d'éliminer l'eau adhérente en excès. Après le mesurage du poids et de la

▼M8

LMC, les anomalies morphologiques manifestes et/ou signes cliniques de toxicité manifeste tels qu'une scoliose (voir l'appendice 8), les pétéchies (petites hémorragies rouges ou violacées au niveau des capillaires sous-cutanés) et les hémorragies sont consignées, et il est recommandé d'employer une méthode numérique d'identification des anomalies.

Collecte et fixation des tissus

46. Les glandes thyroïdes du sous-échantillon de larves sont évaluées en vue de l'histologie. La partie inférieure du torse située à l'arrière des membres antérieurs est retirée et jetée. La carcasse découpée est fixée dans du fixateur de Davidson. Le volume de fixateur dans le conteneur doit être supérieur ou égal à 10 fois le volume approximatif des tissus. Le fixateur est agité ou diffusé de manière appropriée pour fixer convenablement les tissus considérés. Tous les tissus restent dans le fixateur de Davidson pendant au moins 48 heures, mais pas plus de 96 heures, après quoi ils sont rincés à l'eau désionisée et stockés dans du formol à 10 % neutre tamponné (1) (29).

Histologie de la thyroïde

47. Chaque sous-échantillon de larves (tissus fixés) fait l'objet d'une évaluation histologique de la glande thyroïde permettant de poser un diagnostic et d'évaluer l'indice de gravité (29) (30).

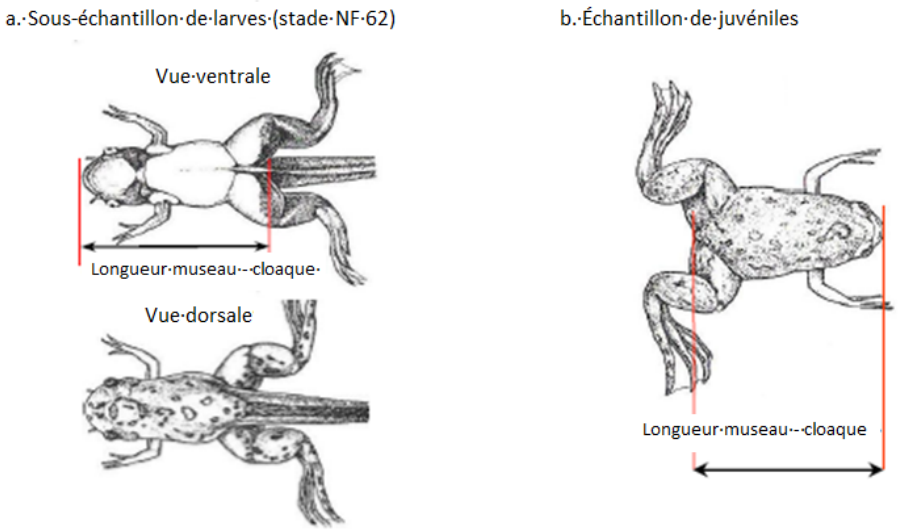


Figure 2: Repères pour le mesurage de la longueur museau-cloaque dans le LAGDA au stade NF 62 (a) et chez les juvéniles (b). Les caractéristiques définissant le stade NF 62 sont que la tête a la même largeur que le tronc, la longueur du nerf olfactif est plus courte que le diamètre du bulbe olfactif (vue dorsale), et les membres antérieurs sont au même niveau que le cœur (vue ventrale). Les images sont adaptées de Nieuwkoop et Faber (1994)

Fin de l'exposition larvaire

48. Compte tenu du nombre initial de têtards, il est probable qu'un faible pourcentage d'individus ne se développeront pas normalement et n'accompliront pas une métamorphose complète (stade NF66) dans un laps de temps raisonnable. La partie larvaire de l'exposition ne devrait pas excéder 70 jours. Les

▼M8

têtards restants à l'issue de cette période sont euthanasiés (voir paragraphe 43), leur poids humide et leur LMC sont mesurés, leur stade de développement est déterminé d'après Nieuwkoop et Faber (1994) et les éventuelles anomalies du développement sont notées.

Sélection après le stade NF66

49. Dix individus par vivier sont conservés à partir du stade NF66 (résorption totale de la queue) jusqu'à la fin de l'exposition. Par conséquent, une fois que tous les animaux ont atteint le stade NF66 ou à l'expiration d'un délai de 70 jours (selon la première éventualité), une sélection est effectuée. Les animaux ayant atteint le stade NF66 mais qui ne seront pas conservés jusqu'à la fin de l'exposition sont choisis au hasard.

50. Les animaux non sélectionnés pour être conservés jusqu'à la fin de l'exposition sont euthanasiés (voir paragraphe 43). Le stade de développement, le poids humide et la LMC (figure 2b) sont mesurés et chaque animal fait l'objet d'une nécropsie macroscopique. Le sexe phénotypique (basé sur la morphologie des gonades) est noté comme étant féminin, masculin ou indéterminé.

Échantillons de juvéniles

Description générale de la préparation des échantillons de juvéniles

51. Les animaux restants continuent d'être exposés jusqu'à 10 semaines après le délai médian jusqu'au stade NF62 dans le témoin contenant l'eau de dilution (et/ou le témoin avec solvant, le cas échéant). À la fin de la période d'exposition, les animaux restants (maximum 10 grenouilles par réplicat) sont euthanasiés, et les divers effets observés sont mesurés ou évalués et consignés: (1) morphométrie (poids et longueur), (2) sex-ratios génotypiques/phénotypiques, (3) poids du foie (indice hépato-somatique), (4) histopathologie (gonades, conduits reproducteurs, foie et reins) et éventuellement (5) VTG plasmatique.

Euthanasie des grenouilles

52. Les échantillons de juvéniles (grenouilles post-métamorphiques) sont euthanasiés par injection intrapéritonéale d'un anesthésique (MS-222 à 10 % dans une solution tamponnée de phosphate appropriée, par exemple). Les grenouilles peuvent être prélevées une fois devenues insensibles (habituellement deux minutes environ après l'injection, en cas d'utilisation de MS-222 à 10 % à raison de 0,01 ml par g de grenouille). Les jeunes grenouilles pourraient être immergées dans un anesthésique plus concentré (MS-222), mais l'expérience a montré qu'une anesthésie selon cette méthode prend plus de temps et que cette durée ne convient peut-être pas pour l'échantillonnage. L'injection permet d'euthanasier les animaux de manière rapide et efficace avant l'échantillonnage. Ce dernier ne doit pas démarrer avant confirmation que les grenouilles sont insensibles, le but étant de s'assurer que les animaux sont bien morts. Si les têtards montrent des signes de souffrance considérable (i.e. sévères et que leur mort est prévisible) et que leur état est moribond, les animaux doivent être anesthésiés puis euthanasiés, et traités comme des cas de mortalité lors de l'analyse des données. Quand un têtard est euthanasié dans ce cas sévère, il faut le consigner dans le rapport d'essai. En fonction du moment de l'essai ou le têtard est euthanasié, il peut être retenu pour une analyse histopathologique, en fixant le spécimen préalablement à une analyse future.

Morphométrie (poids et longueur)

53. La caractérisation du poids humide et de la LMC (**figure 2b**) est identique à celle décrite pour les sous-échantillons de larves.

▼**M8**

VTG plasmatique (optionnel)

54. La VTG est un biomarqueur largement accepté résultant de l'exposition à des produits chimiques œstrogéniques. En ce qui concerne le LADGA, la VTG plasmatique peut éventuellement être mesurée dans des échantillons de juvéniles (ce qui peut être particulièrement utile si le produit chimique d'essai est présumé être un œstrogène).

55. Les membres postérieurs des juvéniles euthanasiés sont sectionnés et le sang est prélevé au moyen d'un tube capillaire hépariné (bien que d'autres méthodes de prélèvement de sang, comme la ponction cardiaque, puissent convenir). Le sang est expulsé dans un tube de microcentrifugation (de 1,5 ml de volume, par exemple) et centrifugé pour obtenir le plasma. Les échantillons de plasma sont conservés à une température inférieure ou égale à -70 °C jusqu'à la détermination de la VTG. La VTG plasmatique peut être dosée par la méthode ELISA (appendice 6) ou par une autre méthode telle que la spectrométrie de masse (31). Les anticorps spécifiques de l'espèce sont préférables en raison de leur plus grande sensibilité.

Détermination du sexe génétique

56. Le sexe génétique de chaque grenouille juvénile est évalué d'après les marqueurs développés par Yoshimoto *et al.* (11). Pour déterminer le sexe génétique, une partie (ou la totalité) d'un membre postérieur (ou de tout autre tissu) retiré au moment de la dissection est prélevée et stockée dans un tube de microcentrifugation (des échantillons de tissus de grenouilles peuvent être obtenus à partir de n'importe quel tissu). Les tissus peuvent être conservés à une température inférieure ou égale à -20 °C jusqu'à l'isolement de l'acide désoxyribonucléique (ADN). L'isolement de l'ADN à partir de tissus peut être effectué au moyen de kits disponibles dans le commerce; la présence ou l'absence du marqueur est analysée par le biais d'une réaction en chaîne par polymérase (PCR) (appendice 5). En règle générale, la concordance entre le sexe histologique et le génotype des animaux témoins au moment de l'échantillonnage des juvéniles dans les groupes témoins est supérieure à 95 %.

Collecte et fixation des tissus pour l'histopathologie

57. Les gonades, les conduits reproducteurs, les reins et les foies sont collectés à des fins d'analyse histologique lors de l'échantillonnage final. La cavité abdominale est ouverte, et le foie disséqué et pesé. Ensuite, les organes digestifs (estomac, intestins, etc.) sont soigneusement retirés de la partie inférieure de l'abdomen pour faire apparaître les gonades, les reins et les conduits reproducteurs. Les éventuelles anomalies morphologiques macroscopiques observées dans les gonades sont notées. Enfin, les membres postérieurs sont retirés s'ils ne l'ont pas déjà été pour le prélèvement du sang. Les foies collectés et la carcasse avec les gonades conservées *in situ* sont immédiatement placés dans du fixateur de Davidson. Le volume de fixateur dans le conteneur doit être supérieur ou égal à 10 fois le volume approximatif des tissus. Tous les tissus restent dans le fixateur de Davidson pendant au moins 48 heures, mais pas plus de 96 heures, après quoi ils sont rincés à l'eau désionisée et stockés dans du formol à 10 % neutre tamponné (1) (29).

Histopathologie

58. Chaque échantillon de juvéniles fait l'objet d'une évaluation histologique visant à déceler une pathologie dans les gonades, les conduits reproducteurs, les reins et les tissus hépatiques; cette évaluation histologique permet de poser un diagnostic et d'évaluer l'indice de gravité (32). Le phénotype gonadique est aussi dérivé de cette évaluation (ovaires, testicules, hermaphrodisme, par exemple); couplées à la caractérisation du sexe génétique de chaque individu, ces observations peuvent servir à calculer les sex-ratios génotypiques/phénotypiques.

▼M8

RÉSULTATS ET RAPPORT

Analyse statistique

59. Le LAGDA génère trois types de données à soumettre à l'analyse statistique: (1) des données quantitatives continues (poids, LMC, IHS, VTG), (2) des données de type «délai avant événement» concernant les rythmes de développement (nombre de jours jusqu'à l'atteinte du stade NF62 à compter du lancement de l'essai) et (3) des données ordinales sous la forme d'indices de gravité ou de stades de développement, issues des évaluations histopathologiques.

60. Il est recommandé de s'assurer que le protocole d'essai et le test statistique sélectionné ont une puissance suffisante pour permettre de déceler des changements d'importance biologique concernant les effets pour lesquels une CSEO ou une CEx doit être rapportée. Il est préférable d'effectuer ces analyses statistiques (en règle générale, sur la base de la moyenne des réplicats) en suivant les procédures décrites dans le document de l'OCDE sur les méthodes actuelles d'analyse des données d'écotoxicité (*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*) (33). L'appendice 7 de la présente méthode d'essai illustre l'arbre de décision recommandé pour l'analyse statistique et donne des indications pour le traitement des données, permettant ainsi de choisir le test ou modèle statistique le plus approprié dans le LAGDA.

61. Les données issues des échantillons de juvéniles (croissance, IHS, par exemple) sont analysées pour chaque sexe génotypique séparément sachant que le sexe génotypique est déterminé pour toutes les grenouilles.

Considérations relatives à l'analyse des données

Utilisation de réplicats et de traitements compromis

62. Une mortalité excessive due à une toxicité manifeste, une maladie ou une erreur technique peut compromettre les réplicats et traitements. Si un traitement est compromis par une maladie ou une erreur technique, trois traitements non compromis et trois réplicats non compromis devront être disponibles pour l'analyse. Si une toxicité manifeste est observée pour la/les dose(s) la/les plus forte(s), il est préférable qu'au moins trois niveaux de traitement avec trois réplicats non compromis soient disponibles pour l'analyse [conformément à l'approche de la concentration maximale tolérée appliquée dans les lignes directrices pour les essais de l'OCDE (34)]. Outre la mortalité, les signes de toxicité manifeste peuvent inclure des effets comportementaux (animaux flottant à la surface, immobiles au fond du vivier, nage inversée ou irrégulière, manque d'activité à la surface, par exemple), des lésions morphologiques (lésions hémorragiques, œdème abdominal, par exemple) ou l'inhibition des réactions normales au régime alimentaire par rapport aux animaux témoins sur le plan qualitatif.

Témoin avec solvant

63. À la clôture de l'essai, les effets potentiels du solvant (en cas d'utilisation d'un solvant) font l'objet d'une évaluation. Pour cela, les résultats correspondant au groupe témoin avec solvant sont comparés à ceux du groupe témoin avec eau de dilution. Les relevés d'observation les plus pertinents dans ce cadre concernent les déterminants de la croissance (poids et longueur), qui peuvent être affectés en cas d'effets toxiques généralisés. Si des différences statistiquement significatives sont décelées entre les relevés d'observation du groupe témoin avec eau de dilution et ceux du groupe témoin avec solvant, un avis d'expert doit permettre de déterminer si la validité de l'essai est compromise. Si les deux témoins diffèrent, les témoins exposés au produit chimique sont comparés au témoin avec solvant, sauf si l'on sait qu'il est préférable de les comparer au témoin contenant l'eau de dilution. S'il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes témoins, il est recommandé de comparer les groupes exposés au produit chimique d'essai avec l'ensemble des deux groupes (témoin avec solvant + témoin avec eau de dilution), sauf si l'on sait qu'il est préférable de les comparer soit au groupe témoin avec eau de dilution soit au témoin avec solvant.

▼M8

Rapport d'essai

64. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Produit chimique d'essai:

— État physique et, si nécessaire, propriétés physico-chimiques;

— Substance mono-constituant:

apparence physique, hydro-solubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude;

identification chimique, telle que désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. (y compris la teneur en carbone organique, si cela se justifie).

— Substance multi-constituants, UVCB et mélanges:

caractérisés autant que possible par l'identité chimique (voir ci-dessus), la teneur et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants.

Espèce soumise à l'essai:

— nom scientifique, souche (si possible), origine, méthode de collecte des œufs fécondés et de manipulation ultérieure.

— incidence de la scoliose chez les témoins historiques en ce qui concerne la culture-mère utilisée.

Conditions d'essai:

— Photopériode(s);

— conception de l'essai (dimensions des récipients, matériel et volume d'eau, nombre de récipients et de réplicats, nombre d'organismes d'essai par réplicat, etc.);

— méthode de préparation des solutions-mères et fréquence de renouvellement (l'agent solubilisant et sa concentration doivent être indiqués le cas échéant);

— méthode de dosage du produit chimique d'essai: pompes doseuses, systèmes de dilution, etc.;

— efficacité de récupération de la méthode et concentrations d'essai nominales, limite de quantification, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types dans les récipients d'essai, méthode analytique utilisée et données montrant que les mesures se réfèrent aux concentrations du produit chimique d'essai en solution vraie;

— caractéristiques de l'eau de dilution: pH, dureté, température, concentration d'oxygène dissous, taux de chlore résiduel (si mesuré), iode total, carbone organique total (si mesuré), solides en suspension (si mesurés), salinité du milieu d'essai (si mesurée) et toute autre mesure effectuée;

— concentrations d'essai nominales, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types;

— qualité de l'eau dans les récipients d'essai, pH, température (quotidiennement) et concentration d'oxygène dissous;

▼**M8**

— informations détaillées sur l'alimentation (type d'aliments, provenance, quantité distribuée et fréquence, etc.).

Résultats:

— données attestant que les témoins répondent aux critères de validité;

— données relatives au groupe témoin (plus témoin avec solvant le cas échéant) et aux groupes traités: mortalité et anomalies observées, délai jusqu'au stade NF62, histologie de la thyroïde (échantillon de larves uniquement), croissance (poids et longueur), IHS (échantillon de juvéniles uniquement), sex-ratios génotypiques/phénotypiques (échantillon de juvéniles uniquement), résultats de l'histopathologie des gonades, des conduits reproducteurs, des reins et du foie (échantillon de juvéniles uniquement) et de la VTG plasmatique (échantillon de juvéniles uniquement, si mesurée);

— approche utilisée pour l'analyse statistique et le traitement des données (test ou modèle statistique utilisé);

— concentration sans effet observé (CSEO)pour chacune des réponses évaluées;

— concentration minimale avec effet observé (CMEO) pour chacune des réponses évaluées (à $r\alpha = 0,05$); CEx pour chacune des réponses évaluées, le cas échéant, et intervalles de confiance (95 %, par exemple), graphique du modèle ajusté utilisé pour calculer la CEx, pente de la courbe concentration-réponse, formule du modèle de régression, estimation des paramètres du modèle et de leurs erreurs-types.

— tout écart par rapport à la méthode d'essai et aux critères d'acceptation; considérations relatives aux conséquences susceptibles d'en découler pour les résultats de l'essai.

65. En ce qui concerne les résultats de la mesure des effets, on présentera les valeurs moyennes et leurs écarts-types (par réplicat et par concentration, si possible).

66. Le délai médian jusqu'au stade NF62 dans les témoins est calculé et présenté comme la moyenne des médianes dans les réplicats et leur écart-type. De même, pour les traitements, une médiane est calculée et présentée comme la moyenne des médianes dans les réplicats et leur écart-type.

BIBLIOGRAPHIE

(1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.

(2) OCDE (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.

(4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 16-27.

▼**M8**

(5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140-144.

(6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.

(7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281-285.

(8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.

(9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.

(10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143-150.

(11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

(12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

(13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441-448.

(14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321-327.

(15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159-169.

(16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.

(17) Chapitre C.4 de la présente annexe, Détermination de la biodégradabilité «facile».

(18) Chapitre C.29 de la présente annexe, Détermination de la biodégradabilité facile – Essai de disparition du CO2.

(19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539-551.

▼**M8**

(20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593-9.

(21) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

(23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.

(24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.

(25) Chapitre C.38 de la présente annexe, Essai de métamorphose des amphibiens.

(26) Chapitre C.48 de la présente annexe, Essai à court terme de reproduction des poissons.

(27) Chapitre C.41 de la présente annexe, Essai de déveoppement sexuel des poissons.

(28) Chapitre C.49 de la présente annexe, Poisson, essai de toxicité aiguë au stade embryonnaire.

(29) OCDE (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology.Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.

(31) Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.

(32) OCDE (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(33) OCDE (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

(34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

▼**M8**

Appendice 1

DÉFINITIONS

Effet apical: effet se répercutant au niveau de la population.

Produit chimiqueune: s substance ou un mélange

ELISA: essai d'immuno-absorption enzymatique (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

CEx: (concentration efficace à x%) concentration qui engendre un effet de x % sur les organismes d'essai durant une période d'exposition déterminée, en comparaison avec un témoin. Par exemple, la CE50 est la concentration estimée produire un effet sur un paramètre évalué de l'essai dans 50 % d'une population exposée durant une période déterminée.

jpf: jours post-fécondation

Essai dynamique: essai caractérisé par l'écoulement continu des solutions d'essai dans le système d'essai pendant la durée de l'exposition.

Axe HHG: axe hypothalamo-hypophyso-gonadique

IUPAC: Union internationale pour la chimie pure et appliquée (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): concentration la plus basse d'un produit chimique d'essai à laquelle on observe un effet statistiquement significatif (à $p < 0,05$) par comparaison avec le témoin. Cependant, toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO devraient avoir un effet nocif supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Si ces deux conditions ne sont pas réunies, il convient de justifier de façon détaillée le choix de la CMEO (et donc de la CSEO). L'appendice 7 donne des indications à ce sujet.

Concentration létale médiane (CL50): concentration d'un produit chimique d'essai dont on estime qu'elle provoquera la mort de 50 % des organismes d'essai au cours de l'essai.

Concentration sans effet observé (CSEO): concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO qui, par comparaison avec un témoin, n'a pas d'effet statistiquement significatif (à $p < 0,05$), durant une période d'exposition déterminée.

SMILES: Spécification d'écriture moléculaire linéaire simplifiée (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*).

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode.

UVCB: substances de composition inconnue ou variable, produits de réactions complexes ou matériels biologiques.

VTG: (vitellogénine) phospholipoglycoprotéine précurseur des protéines du vitellus normalement produite par les femelles sexuellement actives de toutes les espèces ovipares.

▼**M8**

Appendice 2

QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ACCEPTABLE

Substance	Concentration limite
Matière particulaire	5 mg/l
Carbone organique total	2 mg/l
Ammoniac non ionisé	1 µg/l
Chlore résiduel	10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux plus polychlorobiphényles	50 ng/l
Chlore organique total	25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arsenic	1 µg/l
Chrome	1 µg/l
Cobalt	1 µg/l
Cuivre	1 µg/l
Fer	1 µg/l
Plomb	1 µg/l
Nickel	1 µg/l
Zinc	1 µg/l
Cadmium	100 ng/l
Mercure	100 ng/l
Argent	100 ng/l

▼**M8**

Appendice 3

CONDITIONS D'ESSAI POUR LE LAGDA

1. Espèce soumise à l'essai	*Xenopus laevis*
2. Type d'essai	Dynamique (flux continu)
3. Température de l'eau	La température nominale est de 21 °C. La température moyenne pendant toute la durée de l'essai est de 21 ± 1 °C (les différentiels interréplicat et intertraitement n'excèdent pas 1,0°C)
4. Qualité de l'éclairage	Ampoules fluorescentes (à large spectre) 600-2000 lux (lumens/m^2) à la surface de l'eau
5. Photopériode	12 h de lumière pour 12 h d'obscurité
6. Volume de la solution d'essai et récipient d'essai (cuve)	4-10 l (profondeur de l'eau de 10–15 cm minimum) Cuve de verre ou d'acier inoxydable
7. Renouvellement de la solution d'essai, en volume	Constant, afin de garantir la stabilité des conditions biologiques et de l'exposition chimique (5 renouvellements du vivier par jour, par exemple)
8. Âge des organismes d'essai au démarrage	Stade 8-10 d'après Nieuwkoop et Faber (NF)
9. Nombre d'organismes par réplicat	20 animaux (embryons)/cuve (réplicat) au début de l'exposition puis 10 animaux (juvéniles)/cuve (réplicat) à partir du stade NF66 jusqu'à la fin de l'exposition
10. Nombre de traitements	Minimum de 4 traitements par le produit chimique d'essai plus témoin(s) approprié(s)
11. Nombre de réplicats par traitement	4 réplicats de par traitement contenant le produit chimique d'essai et 8 réplicats pour le(s) témoin(s)
12. Nombre d'organismes par concentration d'essai	Minimum de 80 animaux par traitement pour le produit chimique d'essai et minimum de 160 animaux pour le(s) témoin(s)
13. Eau de dilution	Toute eau permettant la croissance et le développement normaux de *X. laevis* (eau de source ou eau du robinet filtrée sur charbon, par exemple)
14. Aération	Aucune aération exigée. L'aération des cuves peut néanmoins se révéler nécessaire si les niveaux d'oxygène dissous tombent en-deçà des limites recommandées et si le flux de solution d'essai est porté au maximum.
15. Oxygène dissous de la solution d'essai	Oxygène dissous: ≥ 40 % de la valeur de saturation en air ou ≥ 3,5 mg/l

▼**M8**

16.	pH de la solution d'essai	6,5-8,5 (les différentiels interréplicat et intertraitement n'excèdent pas 0,5)
17.	Dureté et alcalinité de la solution d'essai	10-250 mg $CaCO_3$/l
18.	Régime alimentaire	(voir appendice 4)
19.	Période d'exposition	Du stade 8-10 jusqu'à dix semaines après le délai médian jusqu'au stade NF62 dans le groupe témoin contenant l'eau de dilution et/ou le solvant (maximum 17 semaines)
20.	Effets biologiques mesurés	Mortalité (et anomalies morphologiques), délai jusqu'au stade NF62 (échantillon de larves), histologie de la thyroïde (échantillon de larves), croissance (poids et longueur), indice hépato-somatique (échantillon de juvéniles), sex-ratios génotypiques/phénotypiques (échantillon de juvéniles), histopathologie des gonades, des conduits reproducteurs, des reins et du foie (échantillon de juvéniles) et vitellogénine plasmatique (échantillon de juvéniles, optionnel)
21.	Critères de validité de l'essai	Concentration d'oxygène dissous > 40 % de la valeur de saturation en air; température moyenne de l'eau de 21 ± 1 °C et différentiels interréplicat et intertraitement < 1,0°C; pH de la solution d'essai entre 6,5 et 8,5; mortalité dans le témoin ≤ 20 % dans chaque réplicat, et délai moyen jusqu'au stade NF62 dans le témoin ≤ 45 jours; poids moyen des organismes d'essai au stade NF62 et à la fin de l'essai dans les témoins et les témoins avec solvant (si un solvant est utilisé) de 1,0 ± 0,2 et 11,5 ± 3 g, respectivement; les données disponibles démontrent que la concentration du produit chimique d'essai en solution a été correctement maintenue dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées.

▼**M8**

Appendice 4

RÉGIME ALIMENTAIRE

Il convient de noter que, bien que ce régime alimentaire soit recommandé, d'autres régimes sont autorisés à condition qu'ils permettent aux organismes d'essai de croître et de se développer à un rythme approprié.

Alimentation des larves

Préparation des aliments à administrer aux larves

A. 1:1 (v/v) nourriture de départ pour truites:algues/TetraFin® (ou équivalent);

1. Nourriture de départ pour truites: mixer 50 g de nourriture de départ pour truites (fines granules ou poudre) avec 300 ml d'eau filtrée appropriée dans un broyeur à grande vitesse pendant 20 secondes

2. Mélange algues/TetraFin® (ou équivalent): mixer 12 g de disques de spiruline avec 500 ml d'eau filtrée appropriée dans un broyeur à grande vitesse pendant 40 secondes, mixer 12 g de Tetrafin® (ou équivalent) avec 500 ml d'eau filtrée puis mélanger le tout afin d'obtenir 1 l à raison de 12 g/l de disques de spiruline et de 12 g/l de Tetrafin® (ou équivalent)

3. Mélanger à proportions égales la nourriture de départ pour truites mixée et le mélange algues/TetraFin®

B. Artémies:

Faire éclore 15 ml d'œufs d'artémia dans 1 l d'eau salée (préparée en ajoutant 20 ml de NaCl à 1 l d'eau désionisée). Après aération pendant 24 heures à température ambiante sous une lumière constante, les artémies sont collectées. L'arrêt de l'aération permet aux artémies de se déposer brièvement pendant 30 minutes. Les kystes flottant à la surface de la boîte sont retirés et jetés, puis les artémies sont filtrées de manière appropriée et plongées dans 30 ml d'eau filtrée.

Protocole alimentaire

Le tableau 1 illustre le type et la quantité d'aliments administrés aux larves pendant toute la durée de l'exposition. Les animaux sont nourris trois fois par jour du lundi au vendredi et une fois par jour le week-end.

Tableau 1

Régime alimentaire des larves de *X. laevis* dans des conditions d'essai dynamique

Temps (*) (post-fécondation)	Nourriture de départ pour truites:algues/Tetra-Fin® (ou équivalent)		Artémies	
	Semaine (3 fois par jour)	Week-end (1 fois par jour)	Semaine (2 fois par jour)	Week-end (1 fois par jour)
J4-14 (des semaines 0-1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (J8-15) 1 ml (à partir de J16)	0,5 ml (J8-15) 1 ml (à partir de J16)
semaine 2	0,67 ml	2,4 ml		
semaine 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
semaine 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
semaine 5	1,6 ml	4, ml	1 ml	1 ml

▼M8

Temps (*) (post-fécondation)	Nourriture de départ pour truites:algues/Tetra-Fin® (ou équivalent)		Artémies	
	Semaine (3 fois par jour)	Week-end (1 fois par jour)	Semaine (2 fois par jour)	Week-end (1 fois par jour)
semaine 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
semaine 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
semaines 8-10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) Le jour 0 correspond au jour de l'injection de hCG

Changement de régime alimentaire entre le stade larvaire et le stade juvénile

Une fois métamorphosées, les larves se voient administrer le régime alimentaire pour juvéniles décrit ci-dessous. Pendant la transition, les rations administrées aux larves sont réduites proportionnellement à l'augmentation de celles administrées aux juvéniles dans chaque groupe de cinq têtards dépassant le stade NF62 et sur le point d'achever leur métamorphose (stade NF66).

Alimentation des juvéniles

Régime alimentaire des juvéniles

Une fois la métamorphose achevée (stade NF66), le régime alimentaire change: seuls des aliments de premier choix pour amphibiens de type 3/32 pouces (Xenopus Express™, FL, États-Unis), ou équivalent, sont administrés.

Préparation de granulés broyés pour la transition entre le stade larvaire et le stade juvénile

Les granulés pour amphibiens sont broyés brièvement dans un moulin à café ou un mixeur ou bien écrasés dans un mortier avec un pilon afin que leur taille soit réduite d'environ un tiers. Un broyage trop long, entraînant la transformation des granulés en poudre, est déconseillé.

Protocole alimentaire

Le **tableau 2** illustre le type et la quantité d'aliments administrés aux juvéniles et aux adultes. Les animaux sont nourris une fois par jour. Il convient de noter que lors de leur métamorphose, les animaux continuent de se voir administrer une partie des artémies jusqu'à métamorphose complète de plus de 95 % des animaux.

Les animaux ne sont pas nourris le jour de la fin de l'essai afin que les aliments ne faussent pas les mesures de poids.

Tableau 2

Régime alimentaire des juvéniles de *X. laevis* dans des conditions d'essai dynamique. Il convient de noter que les animaux non métamorphosés, y compris ceux dont la métamorphose a été retardée par le traitement chimique, ne peuvent pas manger de granulés non broyés

Temps (*) (semaines qui suivent la date médiane de métamorphose)	Granulés broyés (mg par jeune grenouille)	Granulés entiers (mg par jeune grenouille)
Lors de la métamorphose des animaux	25	0
semaines 0-1	25	28

▼**M8**

Temps (*) (semaines qui suivent la date médiane de métamorphose)	Granulés broyés (mg par jeune grenouille)	Granulés entiers (mg par jeune grenouille)
semaines 2-3	0	110
semaines 4-5	0	165
semaines 6-9	0	220

(*) Le premier jour de la semaine 0 correspond à la date médiane de métamorphose des animaux témoins.

▼M8

Appendice 5

DÉTERMINATION DU SEXE GÉNÉTIQUE (SEXAGE GÉNÉTIQUE)

La méthode de sexage génétique chez *Xenopus laevis* est inspirée des travaux de Yoshimoto *et al.*, 2008. Les procédures de génotypage détaillées peuvent être obtenues en consultant cette publication, si nécessaire. Il est possible d'employer des méthodes de substitution (PCR quantitative à haut débit, par exemple) si cela est jugé approprié.

Amorces de X. laevis

Marqueurs DM-W

Sens: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Antisens: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Témoin positif

Sens: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Antisens: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Purification de l'ADN

Purifier l'ADN extrait de tissus musculaires ou cutanés au moyen du kit *Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (cat # 69 506)*, par exemple, ou d'un produit similaire selon les instructions du kit. L'ADN peut être élué des colonnes de centrifugation en utilisant moins de tampon, ce qui permet d'obtenir des échantillons plus concentrés si cela est jugé nécessaire pour la PCR. Notons que l'ADN est assez stable et qu'il convient donc de veiller à éviter toute contamination croisée qui pourrait entraîner une caractérisation erronée des mâles en tant que femelles et vice versa.

PCR

Le **tableau 1** présente un exemple de protocole utilisant JumpStart™ *Taq* de Sigma.

Tableau 1

Exemple de protocole utilisant JumpStart™ *Taq* de Sigma

Mélange maître	1x (µl)	[Final]
Eau stérile exempte de nucléase	11	—
Tampon 10X	2,0	—
$MgCl_2$ (25mM)	2,0	2,5 mM
dNTP (10mM chacun)	0,4	200 µM
Marqueur amorce sens (8 µM)	0,8	0,3 µM
Marqueur amorce anti-sens (8 µM)	0,8	0,3 µM
Témoin amorce sens (8 µM)	0,8	0,3 µM
Témoin amorce antisens (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 unités/µl
Matrice d'ADN	1,0	~200 pg/µl

Note: Lors de la préparation des mélanges maîtres, préparer une quantité de mélange supérieure à la quantité souhaitée pour compenser les pertes pouvant se produire durant le pipetage (utiliser 25x pour 24 réactions seulement, par exemple).

▼**M8**

Réaction:

Mélange	19,0 µl
Matrice	1,0 µl
Total	20,0 µl

Profil du thermocycleur:

Étape 1.	94°C	1 min
Étape 2.	94°C	30 sec
Étape 3.	60°C	30 sec
Étape 4.	72°C	1 min
Étape 5.	Aller à l'étape 2.	35 cycles
Étape 6.	72°C	1 min
Étape 7.	Maintenir à 4°C	

Les produits PCR peuvent être placés immédiatement dans un gel ou conservés à 4°C.

Électrophorèse sur le gel d'agarose (3 %) (protocole-type)

TAE 50X

Tris	24,2 g
Acide acétique glacial	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Ajouter de l'eau jusqu'à 100 ml

TAE 1X

H_2O	392 ml
TAE 50X	8 ml

3:1 Agarose

3 parties d'agarose NuSieve™ GTG™

1 partie d'agarose de Fisher à électroendosmose (EEO) faible

Méthode

1. Préparer un gel 3 % en ajoutant 1,2 g du mélange d'agarose à 43 ml de TAE 1X. Agiter afin de fragmenter les agrégats.

2. Faire chauffer le mélange d'agarose au micro-ondes pendant 2 minutes jusqu'à sa dissolution complète (en évitant de le laisser déborder). Laisser refroidir légèrement.

3. Ajouter 1,0 µl de bromure d'éthidium (10 mg/ml). Agiter le flacon. Le bromure d'éthidium étant un produit mutagène, il est possible de le remplacer par d'autres produits à cette étape afin de réduire au maximum les risques pour la santé des travailleurs. ([1]).

4. Verser le gel dans un moule avec un peigne. Laisser refroidir complètement.

([1]) Conformément à l'article 4, paragraphe 1 de la directive 2004/37/CE du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents cancérigènes ou mutagènes au travail (sixième directive particulière au sens de l'article 16, paragraphe 1, de la directive 89/391/CEE du Conseil), JO L 158 du 30.4.2004, p. 50).

▼**M8**

5. Ajouter le gel dans l'appareil. Recouvrir le gel de TAE 1X.

6. Ajouter 1 µl de 6x colorant de dissociation à chaque volume de 10 µl de produit PCR.

7. Transférer les échantillons à la pipette dans les puits.

8. Effectuer l'électrophorèse à 160 V constants pendant ~20 minutes.

   La **figure 1** présente une image de gel d'agarose montrant des profils de bandes indicatifs d'un individu mâle et d'un individu femelle.

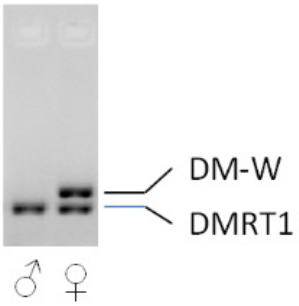


Figure 1: Image de gel d'agarose montrant le profil de bande indicatif d'un individu mâle (♂) (une bande à ~203 bp: DMRT1) et d'un individu femelle (♀) (deux bandes à ~259 bp: DM-W et 203 bp:DMRT1).

BIBLIOGRAPHIE

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

▼M8

Appendice 6

DOSAGE DE LA VITELLOGÉNINE

La vitellogénine (VTG) est dosée suivant une méthode ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) prévue à l'origine pour la VTG des tête-de-boule (Parks *et al.*, 1999). Il n'existe actuellement pas d'anticorps disponibles dans le commerce pour *X. laevis*. Toutefois, étant donné l'abondance des informations relatives à cette protéine et la disponibilité de services commerciaux de production d'anticorps d'un bon rapport qualité-prix, on peut raisonnablement supposer que les laboratoires peuvent facilement développer un test ELISA pour effectuer ce dosage (Olmstead *et al.*, 2009). Olmstead *et al.* (2009) fournissent également une description de l'essai, modifié pour la VTG de *X. tropicalis*, présenté ci-dessous. La méthode utilise un anticorps produit en réaction à la VTG de *X. tropicalis*, mais également connu pour reconnaître la VTG de *X. laevis*. Il convient de noter que des tests ELISA non concurrentiels peuvent également être utilisés, et qu'ils peuvent avoir des limites de détection inférieures à celles de la méthode décrite ci-dessous.

Matériel et réactifs

— Sérum contenant le 1er anticorps (Ac) préadsorbé

— Mélanger 1 mesure de sérum contenant le 1er anticorps anti-VTG de *X. tropicalis* à 2 mesures de plasma de mâles issus du groupe témoin puis laisser reposer à température ambiante pendant ~ 75 minutes, placer sur de la glace pendant 30 min, centrifuger à plus de 20K x G pendant 1 heure à 4^{o}C, retirer le surnageant, aliquoter et conserver à -20^{o}C.

— 2e anticorps

— Conjugué IgG de chèvre anti-lapin-peroxydase de raifort (HRP) (Bio-Rad 172-1019, par exemple)

— Étalon de VTG

— VTG purifiée de *X. laevis* à 3.3 mg/ml.

— TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine) (KPL 50-76-00; Sigma T0440, par exemple)

— Sérum de chèvre (NGS)(Chemicon® S26-100ml, par exemple)

— Plaques de microtitration 96 puits en polystyrène EIA (ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher:07-200-35, par exemple)

— Four à hybridation à 37^{o}C (ou incubateur à air à équilibrage rapide) pour plaques, bain-marie pour tubes

— Autres équipements, produits chimiques et ressources couramment utilisés en laboratoire.

Recettes

Tampon de revêtement (50 mM de tampon carbonate, pH 9.6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
eau	428 ml

PBS 10X (0,1 M de phosphate, 1,5 M de NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
eau	810 ml

▼M8

Tampon de lavage (PBST):

PBS 10X	100 ml
eau	900 ml

Rééquilibrer le pH à 7,3 avec 1 M de HCl, puis ajouter 0,5 ml de Tween-20

Tampon d'essai:

Sérum de chèvre (NGS)	3,75 ml
Tampon de lavage	146,25 ml

Prélèvement des échantillons

Le sang est collecté au moyen d'un tube capillaire hépariné pour micro-hématocrites puis placé sur de la glace. Après centrifugation pendant 3 minutes, le tube est marqué, ouvert, et le plasma expulsé dans des tubes de centrifugation de 0,6 ml contenant 0,13 unité d'aprotinine lyophilisée. (Ces tubes sont préparés à l'avance par ajout de la quantité appropriée d'aprotinine, congélation et lyophilisation dans un concentrateur à vide à faible température jusqu'à séchage complet.) Enfin, le plasma est conservé à -80°C jusqu'à l'analyse.

Procédure pour une plaque

Revêtement de la plaque

Mélanger 20 µl de VTG purifiée à 22 ml de tampon carbonate (concentration finale 3 µg/ml). Verser 200 µl du mélange dans chaque puits d'une plaque 96 puits. Recouvrir la plaque d'un film d'étanchéité adhésif et laisser incuber à 37°C pendant 2 heures (ou à 4°C pendant une nuit).

Blocage de la plaque

Préparer la solution de blocage en ajoutant 2 ml de sérum de chèvre (NGS) à 38 ml de tampon carbonate. Retirer la solution de revêtement puis égoutter en secouant. Verser 350 µl de la solution de blocage dans chaque puits. Recouvrir la plaque d'un film d'étanchéité adhésif et laisser incuber à 37°C pendant 2 heures (ou à 4°C pendant une nuit).

Préparation des solutions étalons

Mélanger 5.8 µl d'étalon de VTG purifiée à 1.5 ml de tampon d'essai dans un tube à essai en verre borosilicaté à usage unique (12 x 75 mm). On obtient ainsi 12 760 ng/ml de solution. Préparer ensuite une dilution en série en ajoutant 750 µl de la dilution précédente à 750 µl de tampon d'essai pour obtenir des concentrations finales de 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 et 50 ng/ml.

Préparation des échantillons

Commencer par une dilution au 1/300 (1 µl de plasma mélangé à 299 µl de tampon d'essai, par exemple) ou au 1/30 du plasma dans le tampon d'essai. Si l'on souhaite obtenir une grande quantité de VTG, il pourra être nécessaire de procéder à des dilutions supplémentaires ou à la dilution de plus grandes quantités. S'efforcer de maintenir la valeur de B/B_o dans la gamme d'étalonnage. En ce qui concerne les échantillons sans VTG appréciable tels que les mâles et les femelles du groupe témoin (qui sont tous immatures), utiliser le rapport de dilution 1/30. Les échantillons moins dilués peuvent induire des effets de matrice non désirés.

En outre, il est recommandé d'analyser un échantillon témoin positif sur chaque plaque. Cet échantillon provient d'un pool de plasma contenant des niveaux élevés de VTG. Le pool de plasma est d'abord dilué dans du sérum de chèvre (NGS), aliquoté puis conservé à -80 °C. Pour chaque plaque, un aliquot est décongelé, dilué dans un tampon d'essai et analysé comme un échantillon d'essai.

▼**M8**

Incubation avec le 1er anticorps

Préparer le premier anticorps en diluant au 1/2 000 du sérum contenant le 1er anticorps préadsorbé dans le tampon d'essai (de 8 µl à 16 ml de tampon d'essai, par exemple). Mélanger 300 µl de la solution contenant le 1er anticorps avec 300 µl d'échantillon/étalon dans un tube en verre. Préparer le tube de B_o suivant la même procédure avec 300 µl de tampon d'essai et 300 µl d'anticorps. De plus, préparer un tube LNS contenant exclusivement 600 µl de tampon d'essai (donc sans anticorps). Recouvrir les tubes de Parafilm puis agiter doucement les tubes au vortex. Incuber dans un bain-marie à 37°C pendant 1 heure.

Lavage de la plaque

Laver la plaque juste avant la fin de l'incubation du premier anticorps. Pour ce faire, secouer la plaque pour la vider de son contenu sur du papier absorbant puis sécher en tamponnant. Ensuite, remplir les puits de 350 µl de solution de lavage, vider et sécher en tamponnant. Une pipette à répétition multicanaux ou un laveur de plaques sont utiles à ce stade. Renouveler le lavage deux fois, ce qui fait trois lavages au total.

Chargement de la plaque

Une fois la plaque lavée, retirer les tubes du bain-marie puis agiter doucement les tubes au vortex. Ajouter 200 µl de chaque tube d'échantillon, d'étalon, de B_o et de LNS pour doubler les puits de la plaque. Recouvrir la plaque d'un film d'étanchéité adhésif et laisser incuber pendant 1 heure à 37°C.

Incubation avec le 2e anticorps

À la fin de l'incubation de l'étape précédente, laver de nouveau la plaque trois fois, comme décrit précédemment. Préparer le deuxième anticorps dilué en mélangeant 2.5 µl du deuxième anticorps à 50 ml du tampon d'essai. Verser 200 µl du deuxième anticorps dilué dans chaque puits, étanchéifier comme précédemment puis incuber pendant 1 heure à 37°C.

Ajout d'un substrat

Une fois achevée l'incubation avec le deuxième anticorps, laver la plaque trois fois, comme décrit précédemment. Verser ensuite 100 µl de substrat TMB dans chaque puits. Patienter pendant 10 minutes (temps de réaction) après avoir placé le mélange de préférence à l'abri d'une source de lumière vive. Interrompre la réaction en ajoutant 100 µl d'acide phosphorique 1 M. Le mélange change alors de couleur, passant du bleu à un jaune intense. Mesurer l'absorbance à 450 nm au moyen d'un lecteur de plaques.

Calcul de B/Bo

Soustraire la valeur LNS moyenne de tous les mesurages. Calculer la B/B_o de chaque échantillon et de chaque étalon en divisant la valeur d'absorbance (B) par l'absorbance moyenne de l'échantillon B_o.

Réalisation de la courbe d'étalonnage et détermination des quantités inconnues

Générer une courbe d'étalonnage à l'aide d'un logiciel de création de graphiques (Slidewrite™ ou Sigma Plot®, par exemple) qui extrapolera la quantité de B/B_o de l'échantillon à partir de la B/B_o des solutions étalons. Habituellement, la quantité est représentée sur une échelle logarithmique, et la courbe est de forme sigmoïde. Toutefois, elle peut apparaître linéaire si la gamme d'étalonnage utilisée est étroite. Corriger les quantités d'échantillon en fonction du facteur de dilution et consigner en mg de VTG/ml de plasma.

Détermination des seuils minimaux de détection

Souvent, en particulier chez les mâles normaux, il n'est pas évident de savoir comment consigner les résultats obtenus pour des valeurs faibles. Dans ces cas, un intervalle de confiance à 95 % est utilisé pour déterminer s'il faut indiquer une valeur «zéro» ou un autre chiffre. Si le résultat de l'échantillon est compris dans l'intervalle de confiance de l'étalon zéro (B_o), il faut lui attribuer la valeur

▼**M8**

«zéro». Le seuil minimal de détection correspondra à l'étalon le plus bas qui est systématiquement différent de l'étalon zéro; autrement dit, les deux intervalles de confiance ne se chevauchent pas. Si le résultat de l'échantillon se situe à l'intérieur ou au-dessus de l'intervalle de confiance du seuil minimal de détection, la valeur calculée sera notée. Si un échantillon est compris entre l'étalon zéro et les intervalles de confiance du seuil minimal de détection, la moitié du seuil minimal de détection est notée en ce qui concerne la valeur de cet échantillon.

BIBLIOGRAPHIE

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113-125.

▼M8

Appendice 7

ANALYSE STATISTIQUE

Le LAGDA génère trois types de données à soumettre à l'analyse statistique: (1) des données quantitatives continues, (2) des données de type «délai avant événement» concernant les rythmes de développement (temps écoulé jusqu'à l'atteinte du stade NF62, (3) des données ordinales (indices de gravité ou stades de développement) issues des évaluations histopathologiques. La figure 1 représente l'arbre de décision recommandé pour l'analyse statistique des données du LAGDA. Des indications utiles pour réaliser cette analyse sont fournies ci-après. En ce qui concerne l'arbre de décision, les valeurs obtenues pour la mortalité, la croissance (poids et longueur) et l'indice hépato-somatique (IHS) sont analysées dans la branche «autres paramètres».

Données continues

Dans un premier temps, on vérifie si les données issues des relevés d'observation continus sont monotones en les transformant en rangs, puis en procédant à une analyse de variance (ANOVA) et en comparant les contrastes linéaires et quadratiques. Si les données se révèlent monotones, il convient d'appliquer le test de Jonckheere-Terpstra aux médianes des réplicats, et aucune autre analyse n'est menée ultérieurement. S'il s'agit de données à distribution normale et à variances homogènes, le test de Williams est également envisageable. Si les données se révèlent non monotones (contraste quadratique significatif et contraste linéaire non significatif), il convient de les analyser à l'aide d'un modèle ANOVA à effets mixtes. On vérifie ensuite si les données suivent une loi normale ou non (de préférence en procédant au test de Shapiro-Wilk ou à celui d'Anderson-Darling) et si leurs variances sont homogènes (de préférence à l'aide du test de Levene). Les deux tests sont appliqués aux résidus du modèle ANOVA à effets mixtes. Quoique préférables, ces tests formels de normalité et d'homogénéité peuvent être remplacés par le recours à l'avis d'experts. Si les valeurs présentent une distribution normale et des variances homogènes, les hypothèses d'un modèle d'ANOVA à effets mixtes sont vérifiées et le test de Dunnett permet de dégager les effets significatifs du traitement. En cas de non-normalité ou d'hétérogénéité de la variance, les hypothèses du test de Dunnett ne sont plus respectées et on essaie de transformer les données pour obtenir leur distribution normale et stabiliser la variance. Si aucune transformation de ce type n'est trouvée, on détermine alors les effets significatifs du traitement à l'aide du test de Dunn. Chaque fois que possible, il y a lieu de pratiquer un test unilatéral plutôt que bilatéral, mais il est nécessaire de se fonder sur l'avis d'experts pour déterminer quel test est adapté à tel ou tel effet mesuré.

Mortalité

Les données relatives à la mortalité sont analysées pendant toute la durée de l'essai et sont exprimées en proportions de décès dans un vivier particulier. Les têtards qui ne se métamorphosent pas complètement dans le délai imparti, les têtards qui font partie de la cohorte de sous-échantillons de larves, les grenouilles juvéniles qui sont sélectionnées ainsi que tout décès dû à une erreur expérimentale sont traités comme des données censurées et ne figurent pas au dénominateur du rapport qui détermine le pourcentage. Avant toute analyse statistique, les proportions de décès font l'objet d'une transformation arc-sinus de la racine carrée. Il est également possible d'utiliser le test de Cochran-Armitage, éventuellement avec correction de type Rao-Scott en cas de surdispersion.

Poids et longueur (données relatives à la croissance)

Les mâles et les femelles n'étant pas sexuellement dimorphes pendant la métamorphose, il convient d'analyser les données relatives à la croissance des larves indépendamment du sexe. En revanche, les données relatives à la croissance des juvéniles sont analysées séparément en fonction du sexe génétique. Une transformation logarithmique peut se révéler nécessaire pour ces relevés d'observation dans la mesure où il n'est pas rare que les données relatives à la taille suivent une loi log normale.

▼**M8**

Indice hépato-somatique (IHS)

Les valeurs relatives au poids du foie sont normalisées par rapport au poids du corps entier (ce qui donne l'IHS) et analysées séparément en fonction du sexe génétique.

Délai jusqu'au stade NF62

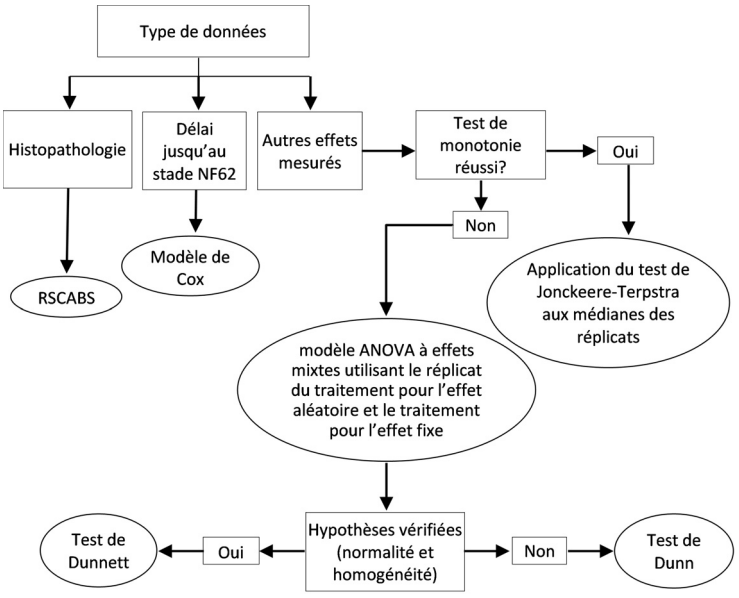
Les données relatives au temps écoulé jusqu'à la métamorphose sont traitées comme des données de type «délai avant événement»; les décès ou individus n'atteignant pas le stade NF62 en 70 jours sont traités comme des données censurées à droite (la valeur réelle est supérieure à 70 jours, mais l'étude se termine avant que les animaux aient atteint le stade NF62 en 70 jours). Le délai médian jusqu'au stade NF62, qui correspond à l'achèvement de la métamorphose dans les témoins avec eau de dilution, est utilisé pour déterminer la date de la fin de l'essai. Le délai médian jusqu'à la fin de la métamorphose peut être déterminé par l'estimateur produit-limite de Kaplan-Meier. Il convient d'analyser ce relevé d'observation à l'aide du modèle à risques proportionnels de Cox à effets mixtes, qui tient compte de la structure des réplicats à l'essai.

Données histopathologiques (indices de gravité et stades de développement)

Les données histopathologiques prennent la forme d'indices de gravité ou de stades de développement. Un test de tendance de Cochran-Armitage avec correction de type Rao-Scott (RSCABS, *Rao-Scott-Cochran-Armitage by Slices*) est appliqué à chaque niveau de gravité dans une réponse histopathologique (Green *et al*., 2014). La correction de type Rao-Scott permet que le plan d'expérience retenu pour les réplicats soit pris en compte dans l'essai. La procédure RSCABS est dite «par tranches» car elle prend en compte la prévision biologique selon laquelle l'effet tend à s'aggraver à mesure que la dose ou la concentration augmente, tout en conservant les scores des individus et en indiquant la gravité des effets détectés. Elle permet de déterminer quels traitements sont statistiquement différents des témoins (c'est-à-dire ceux qui comptent des pathologies plus graves que les témoins), mais aussi à quel indice de gravité cette différence apparaît, et ainsi de placer l'analyse dans un contexte, ce qui est indispensable. Pour ce qui est de déterminer le stade de développement des gonades et des conduits reproducteurs, il convient de soumettre les données à une manipulation supplémentaire car l'une des hypothèses retenues pour le test RSCABS est que la gravité de l'effet augmente avec la dose. L'effet observé peut correspondre à un retard de développement ou à une accélération du développement. D'où la nécessité d'analyser les données relatives au stade de développement comme indiqué afin de détecter une éventuelle accélération du développement, puis de les inverser manuellement avant de procéder à une deuxième analyse en vue de détecter un éventuel retard de développement.

Figure 1

Arbre de décision pour l'analyse statistique des données du LAGDA



▼**M8**

BIBLIOGRAPHIE

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1108-1116.

▼**M8**

Appendice 8

ÉLÉMENTS À PRENDRE EN COMPTE POUR LE SUIVI ET LA RÉDUCTION AU MINIMUM DE LA FRÉQUENCE DE LA SCOLIOSE

La scoliose idiopathique, qui se manifeste habituellement par une queue repliée chez les têtards de *Xenopus laevis*, peut compliquer les observations morphologiques et comportementales dans les populations d'essai. On s'efforcera de réduire au minimum la fréquence de la scoliose voire de l'éliminer, à la fois dans les stocks et dans les conditions expérimentales.

Dans l'essai définitif, il est recommandé que la prévalence de la scoliose modérée et grave soit inférieure à 10 %, afin de renforcer la confiance dans la capacité de l'essai à détecter des effets sur le développement liés au traitement chez des larves d'amphibiens par ailleurs en bonne santé. Les observations quotidiennes effectuées au cours de l'essai définitif permettent d'enregistrer à la fois l'incidence (nombre d'individus) et la sévérité de la scoliose, si présente. La nature de l'anomalie doit être décrite par rapport à sa localisation (antérieure ou postérieure au cloaque, par exemple) et au sens de la courbure (latérale ou dorso-ventrale, par exemple). La gravité peut être classée comme suit:

(NR) non remarquable: absence de courbure

(1) minime: légère courbure latérale postérieure au cloaque; apparente au repos uniquement

(2) modérée: courbure latérale postérieure au cloaque; visible en permanence mais n'empêchant pas le mouvement

(3) grave: courbure latérale antérieure au cloaque; OU toute courbure empêchant le mouvement; OU toute courbure dorso-ventrale

Un comité consultatif scientifique de l'Agence pour la protection de l'environnement des États-Unis (U.S. EPA) sur la loi FIFRA (FIFRA SAP 2013) a examiné les données récapitulatives sur la scoliose issues de quinze essais de métamorphose des amphibiens avec *X. laevis* (stade 51-60+) et a formulé des recommandations générales visant à réduire la prévalence de cette anomalie dans les populations d'essai. Ces recommandations s'appliquent au LAGDA même si cet essai implique un calendrier de développement plus long.

Données historiques relatives au frai

En règle générale, des adultes en bonne santé et de qualité supérieure sont utilisés comme couples reproducteurs; l'élimination des couples reproducteurs dont la progéniture présente une scoliose peut atténuer l'apparition de cette pathologie au fil du temps. Plus précisément, il y a sans doute lieu de recourir le moins possible à des couples reproducteurs capturés dans la nature. La période d'exposition du LAGDA commence avec des embryons au stade 8-10, et il n'est pas possible de savoir, au début de l'essai, si les individus en question présenteront une scoliose. Ainsi, outre le suivi de l'incidence de la scoliose chez les animaux utilisés pour l'essai, les données historiques relatives à la ponte (y compris la prévalence de la scoliose chez les larves autorisées à se développer) doivent être notées. Il peut être utile de continuer à surveiller la portion de chaque ponte non utilisée dans une étude donnée et de rendre compte de ces observations (FIFRA SAP 2013).

Qualité de l'eau

Il importe de veiller à la qualité de l'eau, à la fois dans le stock du laboratoire et pendant l'essai. Outre les critères de qualité de l'eau régulièrement évalués pour les essais de toxicité aquatique, il peut être utile de surveiller et de corriger les éventuelles carences nutritionnelles (carence en vitamine C, calcium ou phosphore, par exemple) ou des niveaux excessifs de sélénium et de cuivre, sachant que ces éléments peuvent provoquer une scoliose à des degrés divers chez les espèces *Rana* et *Xenopus* élevées en laboratoire. (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al*. 1992; Martinez *et al*. 1992; FIFRA SAP 2013). La mise en place d'un régime alimentaire approprié (voir appendice 4) et le nettoyage régulier des viviers permettront généralement d'améliorer la qualité de l'eau et la santé des spécimens d'essai.

▼M8

Régime alimentaire

Les recommandations spécifiques en matière de régime alimentaire, jugées efficaces dans le cadre du LAGDA, sont détaillées à l'appendice 4. Il est recommandé de contrôler la présence dans les aliments de toxines biologiques, d'herbicides et d'autres pesticides, qui sont connus pour provoquer la scoliose chez *X. laevis* et d'autres animaux aquatiques (Schlenk et Jenkins 2013). Ainsi, l'exposition à certains inhibiteurs de la cholinestérase a été associée à une scoliose chez les poissons (Schultz *et al.* 1985) et les grenouilles (Bacchetta *et al.* 2008).

BIBLIOGRAPHIE

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. Science of the Total Environment 392: 110 – 118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. Journal of the World Aquaculture Society 13: 322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraez, and P. Herraez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314-320.

Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. May 21-23, 2013. Washington, DC.